



Impact de l'arsenic inorganique sur la physiologie in vitro des cellules dendritiques humaines

Mélinda Macoch

► To cite this version:

Mélinda Macoch. Impact de l'arsenic inorganique sur la physiologie in vitro des cellules dendritiques humaines. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2013. Français. NNT : 2013REN1B013 . tel-01135887

HAL Id: tel-01135887

<https://theses.hal.science/tel-01135887>

Submitted on 26 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Sciences de la Santé

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Mélinda Macoch

Préparée à l'unité de recherche INSERM U1085 IRSET
Institut de recherche en Santé Environnement Travail
Faculté de Pharmacie

**Impact de l'arsenic
inorganique sur la
physiologie *in vitro*
des cellules
dendritiques
humaines**

**Thèse soutenue à Rennes
le 4 décembre 2013**

devant le jury composé de :

Armelle BAEZA-SQUIBAN

PU – Université Paris Diderot / *rapporteur*

Frédéric BATTEUX

PU/PH – Université Paris Descartes et hôpital
Cochin / *rapporteur*

Olivier FARDEL

PU/PH – Université de Rennes 1 et CHU de
Rennes / *examineur*

Saadia Kerdine-Romer

PU – Université Paris Sud / *examineur*

Laurent Vernhet

PU – Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

Remerciements

Une page se tourne à l'issue de ces trois ans. Plusieurs personnes, que je tiens à remercier ici, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens en premier lieu à remercier la Ligue contre le Cancer d'avoir financé la moitié de cette thèse, et tout particulièrement ses donateurs et bénévoles qui font vivre l'association. Je remercie également la région Bretagne qui en a financé l'autre moitié, ainsi que l'INCA (Institut National du Cancer), dont la subvention a également contribué au bon déroulement de ce travail.

Je remercie le Dr. Dominique Lagadic-Gossman pour m'avoir intégrée au sein de l'ex EA-SeRAIC, maintenant rattaché à l'IRSET (Institut de Recherche en Santé Environnement Travail). Je remercie également le Pr. Olivier Fardel pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe C2I « Contaminants Chimiques, Immunité et Inflammation », et également pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également les autres membres du jury pour avoir consenti à juger ce travail, et ainsi contribuer à son aboutissement. Je remercie ainsi le Pr. Armelle Baeza-Squiban et le Pr. Frédéric Batteux qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail et le Pr. Saadia Kerdine-Römer qui a accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Laurent Vernhet pour m'avoir donné l'opportunité d'entreprendre ce travail de thèse. Merci Laurent d'avoir été un encadrant pédagogue et toujours disponible durant ces trois ans. Merci également pour la rigueur scientifique qui a entouré ce travail, et qui m'a permis de mener à bien cette thèse, dont je garderais un très bon souvenir, et qui m'a énormément apporté tant d'un point de vue scientifique que humain.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe C2I, toujours de bon conseil, et grâce à qui il règne dans cette équipe un esprit d'entraide et une ambiance chaleureuse; Eric Le Ferrec, Valérie Lecureur, Lydie Sparfel, Marc Le Vee et Elodie Jouan.

Je n'oublie pas bien sûr Claudie, reine du western et du bilig, qui aura accompagné mes premiers pas dans le laboratoire. J'ai beaucoup apprécié d'être ta voisine de paillasse durant ces trois ans, qui auront été ponctués de nombreux moments de rigolade. Je te laisse en souvenir mon musée des horreurs, qui, j'ai vu, occupe maintenant une place de choix, et je souhaite que tes prochaines aventures à venir au labo soient pleines de bonnes surprises.

Merci à la Marie, avec qui j'ai parcouru une grande partie de ce chemin de thèse, accompagnée de nombreuses discussions culinaires, portant notamment sur les suprêmes de volailles, ainsi que par des remarques très pertinentes sur les bébés congelés. J'ai beaucoup apprécié d'être ta voisine de bureau. Il ne me reste plus qu'à te souhaiter bon courage pour la fin de ta thèse, et sache que si je suis dans le coin, je me ferais un plaisir de te soutenir lors de ta rédaction !

Merci à Kévin, le doctorant aux multiples surnoms, qui jugeais souvent opportun de venir mettre furtivement un peu d'animation dans notre U, de préférence lors d'une extraction d'ARN ou d'un dépôt d'échantillons de Western. Merci en particulier pour votre soutien à toi et à Simon lors de ma rédaction à grands renforts de nourriture; je ne suis pas prête d'oublier ma première

flammenkuche cuisinée en territoire breton ! Je te souhaite également plein de courage pour la dernière ligne droite ; vivement que l'on puisse t'appeler docteur...

Je n'oublie pas bien sûr Simon, compatriote égaré lui aussi à plus de huit cents kilomètres de chez lui. Cela aura été un plaisir de discuter de choses diverses et variées avec toi, qui allaient des traditionnelles querelles alsaciens-lorrains à des épopées potentielles en territoire inuit, en passant par la thématique phare : la cuisine ! Bonne chance pour la suite, homme sapin !

Un grand merci bien sûr à Laurie, l'élément déclencheur de nombreuses discussions pas très formelles au RU (ou ailleurs !). J'ai beaucoup apprécié les échanges intéressants que l'on a pu avoir sur des sujets divers, ponctués de tes remarques toujours tout en finesse, cela va de soi. Je voulais te remercier également pour ton soutien involontaire, lorsque l'on rédigeait toute les deux dans la solitude du mois d'août. Rigoler un bon coup de temps en temps nous aura fait je pense le plus grand bien ! J'espère que la roue va tourner pour toi, et que l'opportunité de faire une thèse se présentera très vite.

Je remercie également Medjda, pour nos discussions sur des thèmes autant scientifiques que non scientifiques, ses gâteaux qui étaient toujours un délice, ainsi que pour ses démonstrations de danse mémorables ; Octavie pour nos discussions « bricolage » et Adeodat, pour sa bonne humeur contagieuse ; Brigitte Bardot, pour tous les petits services toujours accompagnés d'un sourire ; Dominique Bonnier, pour sa gentillesse et ses bons conseils ; Marine et Valérie, pour le soutien et les bons moments passés dans le labo et en-dehors ; Brigitte, Sylvie et Patricia, les secrétaires de physio, pour tous les services rendus ; Mickaël, dont je ne suis pas prête d'oublier les envolées musicales, ainsi que les ex-doctorants et techniciens partis vers de nouveaux horizons : Elise, Abdullah, Julie, Sandrine, Noémie, Laetitia et Anthony.

Je souhaite également remercier le groupe scout et guide de France « Henri Grouès », qui m'aura permis de vivre durant ces trois années à Rennes cette formidable aventure humaine qu'est le scoutisme. Merci à vous les jeunes de m'avoir apporté toutes ces choses auxquelles je ne m'attendais pas quand j'ai revêtu la chemise scoute. Merci également aux chefs et cheftaines avec qui j'ai eu l'occasion de m'occuper des « bleus » : Guillaume, Claire, Lucile, Adélie, Laurelle et Arthur. Merci particulièrement pour la complicité et le respect mutuel qui régnait entre nous et qui était nécessaire à un encadrement efficace et à une bonne ambiance dans la maîtrise.

Merci également à toi Nicolas, pour nos promenades et « échappées nomades », autrement nommées « weekend bâche », qui auront été une sacrée bulle d'oxygène durant ces trois années. Merci également pour tous les petits services rendus qui auront contribué à me faciliter la vie, notamment dans la dernière ligne droite.

Je ne peux finir sans remercier mes parents. Les études n'étant pas gratuites, votre soutien financier m'a permis d'arriver jusqu'en master 2. Mais j'ai aussi pu compter durant ces années sur votre soutien moral quand les choses n'étaient pas forcément au beau fixe. Et bien sûr, je vous suis également très reconnaissante d'avoir fait le trajet depuis l'Alsace pour assister à ma soutenance, qui est la conclusion de toutes ces années d'étude.

Sommaire

Liste des abréviations	8
Liste des figures et tableaux.....	10
I.1 Liste des figures.....	10
I.2 Liste des tableaux	11
INTRODUCTION.....	12
I. Généralités sur l'arsenic	12
I.1 Identité et propriétés physiques de l'arsenic.....	12
I.2 Sources d'exposition et utilisation de l'arsenic	14
I.3 Toxicocinétique de l'arsenic.....	19
I.3.1 Absorption	19
I.3.2 Distribution.....	19
I.3.3 Métabolisme	20
I.3.4 Elimination	22
I.4 Bases moléculaires et cellulaires des effets de l'arsenic	23
I.4.1 Caractère thioloprive	23
I.4.2 Adaptation cellulaire à l'arsenic	23
I.4.2.1 Altération du statut redox	23
I.4.2.2 Récepteurs et voies de signalisation	27
I.4.2.3 Facteurs de transcription.....	28
I.4.3 La voie de signalisation Nrf2.....	29
I.4.3.1 Fonctions biologiques de Nrf2	29
I.4.3.2 Activation de la voie Nrf2	30
I.4.3.3 Régulation transcriptionnelle de Nrf2	31
I.4.3.4 Activation et modulation de l'activité de la voie Nrf2 par l'arsenic	32
II. Toxicité de l'arsenic chez l'Homme	33
II.1 Toxicité aigue	33
II.1.1 Symptômes cliniques d'une intoxication aigue	33
II.2 Toxicité chronique.....	34
II.2.1 Cancérogénicité	34
II.2.1.1 Cancers dont l'incidence est augmentée par l'arsenic	34
II.2.1.2 Mécanismes de carcinogénicité	35
II.2.2 Effets systémiques non tumoraux.....	36
II.3 Usage thérapeutique de l'arsenic	38
II.3.1 La leucémie aigue promyélocytaire.....	39

II.3.1.1	Physiopathologie de l'APL.....	39
II.3.1.2	Efficacité de du trioxyde d'arsenic dans le traitement de l'APL.....	39
II.3.1.3	Bases moléculaires des effets anticancéreux de l'arsenic.....	41
II.3.2	Perspectives pour l'usage thérapeutique de l'arsenic	42
II.4	Effets toxiques de l'arsenic vis-à-vis des cellules immunitaires humaines	43
II.4.1	Arsenic et LTs	44
II.4.2	Arsenic et macrophages.....	45
II.4.3	Arsenic et cellules dendritiques.....	46
III.	Les cellules dendritiques	48
III.1	Classification des DCs.....	48
III.2	Les DCs humaines dérivées des monocytes.....	49
III.2.1	Différenciation in vitro des DCs à partir des monocytes.....	49
III.2.2	Phénotype des DCs immatures	50
III.2.3	Phénotype des DCs matures	51
III.3	Fonctions biologiques de la cellule dendritique	52
III.3.1	Capture et présentation de l'antigène par les DCs (Figure 12).....	52
III.3.2	Orientation de la réponse immunitaire	54
III.4	Rôle physiopathologique des DCs.....	56
III.4.1	DC et cancers.....	56
III.4.2	DCs et autoimmunité	57
III.5	Caractéristiques fonctionnelles de quelques cytokines sécrétées par les DCs.....	57
III.5.1	Interleukine 12 (IL-12)	57
III.5.2	Interleukine 23 (IL-23)	58
III.5.3	Interleukine 8 (IL-8)	59
III.5.4	Interleukine 10 (IL-10)	59
III.5.5	Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)	60
III.6	Les TLRs	60
III.6.1	Description de la famille des TLRs	60
III.6.2	Voies de signalisation activées par les TLRs	62
III.6.2.1	La voie dépendante de Myd88.....	62
III.6.2.2	La voie dépendant de TRIF	62
III.6.3	Effet synergique de l'IFN- γ avec la signalisation des TLRs	63
OBJECTIFS	66
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		68
I.	Produits chimiques et réactifs.....	68
II.	Culture cellulaire	68

II.1	Génération des cellules dendritiques humaines.....	68
II.1.1	Obtention des cellules dendritiques immatures (iDCs)et matures (mDCs).....	68
II.1.2	Traitements des cellules par As(III)	69
II.2	Isolement des lymphocytes T humains (LTs).....	70
III.	Détermination de la viabilité cellulaire	71
III.1	Test d'exclusion au bleu trypan.....	71
III.2	Marquage à l'iodure de propidium	72
IV.	Immunophénotypage des populations cellulaires.....	72
V.	Détermination de l'activité endocytique des iDCs	73
VI.	Co-cultures des DCs avec les LTs CD4 ⁺	73
VI.1	Cultures cellulaires	73
VI.2	Evaluation de la prolifération des LTs en co-culture.....	74
VII.	Quantification des niveaux de cytokines sécrétées par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	75
VIII.	Détection des EAOs.....	75
IX.	Analyse de l'expression génique	76
IX.1	Extraction et dosage des ARNs	76
IX.2	Transcription inverse (RT)	76
IX.3	Réaction de Polymérisation Quantitative en temps réel (q-PCR).....	76
X.1	Préparation des échantillons et dosage des protéines	77
X.2	Electrophorèse sur gel et transfert sur membrane.....	78
X.3	Détection des protéines d'intérêts.....	80
XI.	Extraction nucléaire.....	81
XII.	Détermination de la liaison des facteurs de transcription à leur éléments de réponse par la méthode du TransAM.....	81
XIII.	Extinction de Nrf2 par transfection de siRNA	82
XIV.	Analyses statistiques.....	83

RÉSULTATS

Partie I : Impact de l'arsenic inorganique sur le processus de différenciation des monocytes humains en cellules dendritiques fonctionnelles.....84

I.1	Effets d'As(III) sur l'expression membranaire des marqueurs de différenciation des iDCs	84
I.2	Effets d'As(III), à doses non cytotoxiques, sur la fonction d'endocytose des iDCs	85
I.3	Effets d'As(III) sur l'expression membranaire des marqueurs de maturation des DCs	85
I.4	As(III) réprime l'expression de l'IL-12p70 et de l'IL-23 dans les mDCs	85
I.5	L'arsenic inhibe significativement l'expression des cytokines induites par les agonistes des récepteurs TLR7/8 et TLR2	86
I.6	Impact de la différenciation des iDCs en présence d'As(III) sur la capacité des mDCs à stimuler des LTs CD4 ⁺ humains en co-culture	87

Partie II : Impact direct de l'arsenic inorganique sur la maturation des cellules dendritiques humaines98

II.1 Effets d'As(III) sur la viabilité des mDCs et sur l'expression membranaire des marqueurs de maturation	98
II.2 As(III) inhibe l'expression de l'IL-12p70 dans les mDCs.....	98
II.3 Impact d'As(III) sur les principales voies de signalisation induites par le LPS.	99
II.4 L'arsenic augmente l'expression des gènes de réponse au stress et de la protéine Nrf2	100
II.5 Le tBHQ prévient également l'augmentation des niveaux d'ARNm IL12A et IL12B dans les mDCs.	101
II.6 L'extinction de la protéine Nrf2 prévient l'induction de l'expression du gène NQO1 par l'As(III)	101
II.7 L'extinction de la protéine Nrf2 prévient en grande partie la répression des gènes IL12A et IL12B induite par As(III) et le tBHQ dans les mDCs.....	101
DISCUSSION	110
BIBLIOGRAPHIE.....	122
ANNEXES	136

Liste des abréviations

AP1: Activator Protein 1	EAE: Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale
APL : Leucémie aigue promyélocytaire	EA0: Espèces Activées de l'Oxygène
AQP: Aquaglycéroporine	ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ARE: Antioxydant Responsive Element	EpRE: Electrophile Responsive Element
As(III): Arsenic inorganique trivalent (dans notre étude, l'arsénite de sodium)	ERK: Extracellular signal Regulated Kinase
As(III)MT : Arsenic(III) Méthylatransférase	FDA: Food and Drug Administration
As(V): Arsenic inorganique pentavalent	FITC: Fluorescein isothiocyanate (Isothiocyanate de fluorescéine)
ATDSR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry	GCL : Glutamate Cystéine Ligase
ATRA : Acide tout trans rétinoïque	GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
B(a)P : Benzo(a)pyrene	GPI: Glycosylphosphatidylinositol
bZip: Basic leucine zipper (domaine en glissière à leucine)	GPx : Glutathion peroxydase
CBP : CREB Binding Protein	GRed : Glutathion reductase
CCA : Chromated Copper Arsenate (Arséniate de cuivre chromé)	GS : Glutathion Synthétase
CCL19,21 : C-C Chemokine Ligand 19, 21	GSH: Glutathion
CCR7 : C-C Chemokine Receptor 7	GSK-3β : Glycogen Synthase Kinase-3β
CDP : Common DC Progenitor	GSSG: Glutathion disulfure
CFSE : Carboxyfluorescéinediacetatesuccinimidyl ester	GSTO1-1 : Glutathion S-transférase de classe 1
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer	GVHD : Chronic graft-versus-host disease
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	HO-1 : Heme Oxygenase 1
CNC : Cap'n'collar (domaine)	HRP: Horseradish Peroxydase
CPA : Cellules Présentatrice de l'Antigène	ICAM: Intercellular Adhesion Molecule
CRE : cAMP Response Element	iDCs: Cellule dendritique immature
Crm1 : Chromosomal Region Maintenance 1	IDO-1 : indoleamine 2,3 dioxygénase 1
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte (LT CD8 ⁺)	IKK: IκB kinase
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4	IFN: Interferon
Cul3: Cullin based E3 ligase	IL: Interleukine
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern	IRAK: IL1R associated kinase
DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	IRF: Interferon Regulatory Factor
DD : Death Domain	JAK: Janus Kinase
DHR : Dihydrorhodamine	JNK: c-Jun N-terminal kinase
DMA (III): Diméthylarsinite	Keap1: Kelch associated protein 1
DMA (V): Diméthylarsinate	hTERT: (human Telomerase Reverse Transcriptase)
DSS : Dextran Sulfate Sodium	Keap1: Kelch associated protein 1
DTT : Dithiothreitol	LB : Lymphocyte B
	LED : Lupus Erythémateux Disséminé
	LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1
	LT: Lymphocyte T

LPS: Lipopolysaccharide	PMSF : Phenylmethylsulfonylfluoride
Mal : Myd88 Adapter Like	PRR: Pattern Recognition Receptor
Maf: Musculo-Aponeurotic Fibrosarcoma	RARα: Retinoic Acid Receptor
MAP-Kinase: Mitogen Activating Protein Kinase	ROR-γT: RAR-related orphan receptor- γ T
MAPK-Kinase: Mitogen Activating Protein Kinase Kinase	SAM: S adenosylmethionine
MAPKK-Kinase: Mitogen Activating Protein Kinase Kinase Kinase	SAPK: Stress Activated Protein Kinase
MD2: Myeloid Differentiation Factor	SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
mDC: Cellule dendritique mature	SOD: Superoxyde Dismutase
MICI: Maladies inflammatoires chroniques intestinales	STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
MFI: Mean of Fluorescence Intensity	Sp1: Spécific Protein 1
MLR: Mixed leucocytes reaction)	SQSTM-1: Sequestosome 1
MMA (III): Méthylarsonite	SVF-DC: Sérum de veau foetal décomplémenté
MMA (V): Méthylarsoniate	TAK1: TGF- β activated kinase 1
MSMA: Méthylarséniate monosodique	T-bet : T-box transcription factor TBX21
Myd88: Myeloid differentiation primary response gene 88	tBHQ : tert-Butylhydroquinone
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	TBK1: TANK Binding Kinase
Neh: Nrf2-ECH homology	TCR: T Cell Receptor
NER: Nucleotide Excision Repair	TGF-β: Tumor Growth Factor- β
NF-κB: Nuclear Factor- κ B	TIRAP: Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
NK: Natural Killer	TLR: Toll Like Receptor
NQO1 : NADPH quinone oxydoréductase 1	TNBS: Acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique
Nrf2: Nuclear factor Erythroid 2 (NF-E2) related transcription factor	TNF-α: Tumor necrosis factor
PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern	TRAF: TNFR associated factor
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells (cellules mononuclées de sang périphérique)	TRAM: Toll-like receptor 4 adaptor protein
PHA : Phytohémagglutinine	TRE: TPA Response Element
PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate	TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
PML: Promyélocytic Leukemia (protéine)	pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes
	US-EPA : United States Environmental Protection Agency

Liste des figures et tableaux

I.1 LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de quelques composés arséniés présents dans l'environnement.....	13
Figure 2 : Cycle géochimique simplifié de l'arsenic et concentrations dans les différents compartiments	14
Figure 3 : Répartition mondiale des eaux souterraines contaminées par l'arsenic d'origine naturelle ou anthropique	15
Figure 4 : Sources de libération et d'exposition humaine à l'arsenic.....	18
Figure 5 : Métabolisme de l'arsenic chez l'Homme.....	21
Figure 6 : Balance entre pro-oxydants et antioxydants présente dans la cellule	24
Figure 7 : Impact de l'arsenic sur la génération des EAO et sur les systèmes anti-oxydants associés au glutathion.....	25
Figure 8 : Voie de signalisation Nrf2 et hypothèses d'activation par l'arsenic.....	31
Figure 9 : Manifestations associées à une exposition chronique à l'arsenic	36
Figure 10 : Blocage de la différenciation au stade promyélocyte suite à la translocation chromosomique t(15 ;17).	39
Figure 11 : Evolution de la concentration plasmatique en arsenic d'un patient atteint d'APL traité au Trisenox	40
Figure 12 : Capture et présentation de l'antigène aux LTs par la DC	53
Figure 13 : Principaux acteurs moléculaires de la synapse immunologique	54
Figure 14 : Différents sous-types de lymphocytes et cytokines impliquées dans leur différenciation	56
Figure 15 : Voies de signalisation MyD88 et TRIF dépendantes.....	64
Figure 16 : Principe du tri de monocytes par sélection positive.....	69
Figure 17 : Modèle expérimental utilisé pour étudier les effets d'As(III) sur la différenciation des DCs.....	70
Figure 18 : Modèle expérimental utilisé pour étudier les effets d'As(III) sur la maturation des DCs	70
Figure 19 : Principe du tri de LTs CD4 ⁺ par sélection négative.....	71
Figure 20 : Modèle expérimental employé lors des cocultures de DCs avec des LTs CD4 ⁺	74
Figure 21 : Principe utilisé lors de l'évaluation de la liaison des facteurs de transcription à leurs éléments de réponse.....	82
Figure 22 : Effet d'As(III) sur l'expression membranaire des marqueurs de différenciation DC-SIGN et CD1a.	89
Figure 23 : Effets d'As(III) sur la viabilité des iDCs.	90
Figure 24 : Effet d'As(III) sur les fonctions d'endocytose des iDCs.	91
Figure 25 : Effet du LPS sur l'expression membranaire des marqueurs de maturation des DCs.....	92
Figure 26 : Effet d'As(III) sur l'expression membranaire des marqueurs de maturation induite par le LPS.....	92
Figure 27 : As(III) inhibe la sécrétion d'IL-12p40, d'IL-12p70, d'IL-23 et d'IL-6 dans les mDCs.	93
Figure 28 : Le LPS induit l'expression de gènes codant différentes cytokines dans les DCs.	94
Figure 29 : As(III) réprime l'induction des niveaux d'ARNm des gènes IL12A, IL12B et IL6 dans les DCs stimulées avec le LPS.	94
Figure 30 : As(III) inhibe la sécrétion d'IL-12p70 et d'IL-23 des DCs stimulées avec des agonistes des TLR7/8 ou TLR2.	95
Figure 31 : As(III) inhibe la sécrétion d'IL-12p70 des DCs stimulées avec le cocktail de cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 β et TNF- α	96
Figure 32 : Impact de la différenciation des iDC en présence d'As(III) sur la capacité des mDCs à stimuler les LTs CD4 ⁺ humains.	97
Figure 33 : Impact d'As(III) sur la viabilité et sur l'expression membranaire des marqueurs de maturation des DCs.	103
Figure 34 : As(III) inhibe l'expression d'IL-12p40 et d'IL-12p70 dans les mDCs.	104
Figure 35 : Impact d'As(III) sur les principales voies de signalisation activées par le LPS.	105
Figure 36 : As(III) et tBHQ stimulent l'expression des gènes de réponse au stress et de la protéine Nrf2 dans les DCs.	106
Figure 37 : Le tBHQ inhibe l'expression des gènes IL12A et IL12B dans les mDCs.	107
Figure 38 : L'extinction de la protéine Nrf2 réduit l'expression du gène NQO1 dans les DCs.....	108

Figure 39 . L’extinction de la protéine Nrf2 prévient la répression des gènes IL12A et IL12B induite par As(III) et le tBHQ dans les DCs activées.	109
--	-----

I.2 LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Distribution urinaire de l’arsenic inorganique et de ses métabolites dans plusieurs populations ...	22
Tableau 2: Les TLRs et leurs ligands existant chez l’Homme	61
Tableau 3 : Marqueurs membranaire utilisés pour l’immunophénotypage des monocytes, iDCs et mDCs	72
Tableau 4 : Primers utilisés lors des analyses par q-PCR.....	79
Tableau 5 : Anticorps utilisés dans la détection de protéines d’intérêt par Western-Blot.....	80

I. GENERALITES SUR L'ARSENIC

I.1 IDENTITE ET PROPRIETES PHYSIQUES DE L'ARSENIC

L'arsenic (PM= 74,92 g/mol) est un élément présent naturellement et de manière hétérogène dans la croûte terrestre à une concentration moyenne de 2mg/kg (INERIS, 2010). Cet élément est classé comme métalloïde, c'est-à-dire qu'il possède des propriétés physico-chimiques intermédiaires entre celles des métaux et des non métaux. A ce titre, il se comporte notamment comme un composé semi-conducteur.

L'arsenic se présente sous différentes formes dans l'environnement ; l'arsenic élémentaire, qui existe sous trois formes allotropiques : jaune (forme α), noire (forme β), et grise (forme γ), cette dernière étant composée de cristaux gris d'aspect métallique, et constituant la forme la plus stable et la plus répandue (Laperche et al., 2003). Néanmoins ces formes sont rarement présentes à l'état pur dans l'environnement, et l'arsenic est plus fréquemment retrouvé associé avec d'autres éléments, formant des composés arséniés principalement inorganiques, mais également organiques (Figure 1). Dans les espèces inorganiques, l'arsenic est couramment associé à l'oxygène ou au soufre. La plupart des composés arséniés est sans odeur ni goût, ce qui les rend difficile à détecter dans l'eau de boisson, la nourriture ou l'air inhalé (ATDSR, 2007). Les formes les plus abondantes dans l'environnement sont les formes inorganiques dont la spéciation varie en fonction des conditions physico-chimiques rencontrées (Duker et al., 2005). Cependant, différents paramètres biologiques, et notamment l'activité microbiologique, favorisent également la formation de composés organiques (Molénat et al., 2000).

L'arsenic inorganique présente 4 degrés d'oxydation (ATDSR, 2007):

-III, comme dans le tri-hydrure d'arsenic, également appelé arsine (AsH_3), ou dans les sels d'arséniure

0, pour l'arsenic sous sa forme native élémentaire

+III, qui est l'état trivalent de l'arsenic, comme dans les arsénites

+V, l'état pentavalent, présent par exemple dans les arséniates,

De manière générale, des conditions oxydantes vont favoriser la présence d'arséniates, alors que des conditions légèrement réductrices favoriseront la formation des arsénites (Jones, 2007).

Ainsi les espèces d'arsenic présentes dans l'environnement varient en fonction du compartiment dans lequel elles se trouvent : aqueux, atmosphérique ou dans les sols. Dans l'atmosphère, à l'exception de quelques formes gazeuses comme l'arsine ou certains composés organiques, l'arsenic est à 90% adsorbé à des particules, principalement sous forme de trioxyde d'arsenic (Matschullat, 2000; ATDSR, 2007).

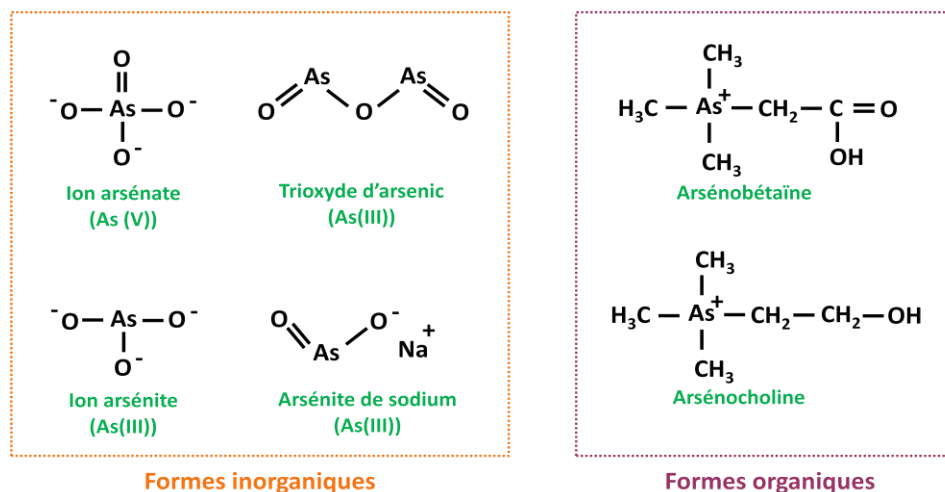


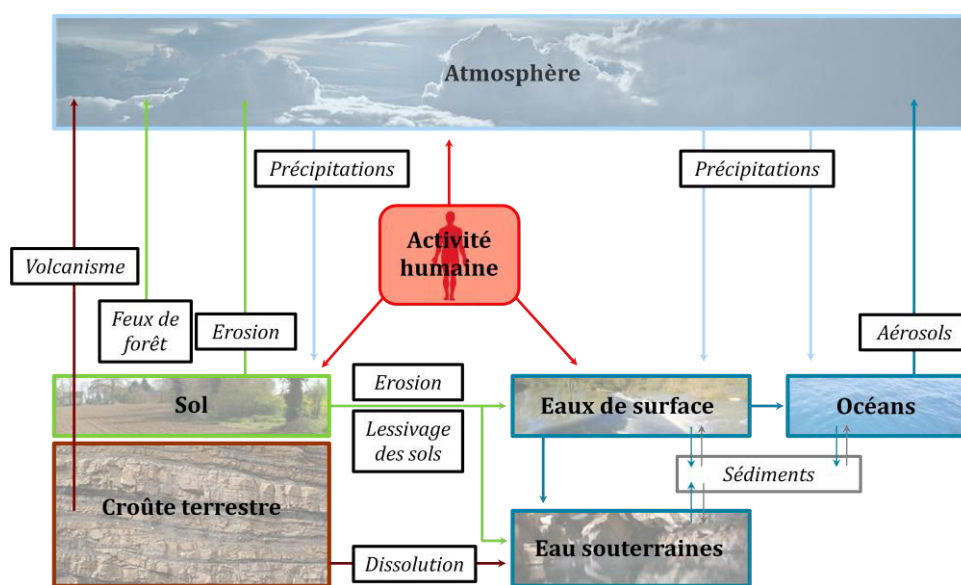
Figure 1: Structure de quelques composés arséniés présents dans l'environnement

En milieu aqueux, les espèces retrouvées vont être en grande partie des arsénites et des arsénates, avec une prédominance des arsénates dans les eaux bien aérées, comme les eaux de surface, et des arsénites dans les eaux souterraines, du fait de conditions souvent réductrices (Molénat et al., 2000). Cependant, la solubilité de l'arsenic dépend principalement de sa spéciation et, de manière générale, les dérivés pentavalents sont plus solubles dans l'eau que les dérivés trivalents, hormis l'arsénite de sodium (ATDSR, 2007). Dans les sols, les formes inorganiques, en particulier pentavalentes, sont prédominantes (INERIS, 2010). Cette spéciation varie toutefois avec les apports d'arsenic d'origine anthropique qui peuvent augmenter considérablement et durablement les concentrations d'espèces organiques dans les sols (Molénat et al., 2000 ; ATDSR, 2007).

L'arsenic est présent naturellement et inégalement dans les roches. Ainsi des zones géologiques à fortes teneur en arsenic (jusqu'à 200 mg/kg, INERIS, 2010) coexistent avec des zones en contenant peu (0,1 mg/kg, Molénat et al., 2000). Du fait de sa forte affinité pour le soufre, ce métalloïde forme dans la croûte terrestre des minerais tels que le réalgar (As_4S_4), l'orpiment (As_2S_3) ou l'arsenopyrite (FeAsS) qui sont insolubles dans l'eau. Sous cette forme, l'arsenic est immobilisé dans l'environnement (Jones, 2007; Laperche et al., 2003; Smedley et Kinniburgh, 2002).

Les différentes propriétés physico-chimiques des sols influent sur la mobilité de l'arsenic dans l'environnement. Ce métalloïde subit des transformations et un transport dans l'environnement selon un cycle géochimique complexe pouvant entraîner des expositions humaines. Le principal apport naturel d'arsenic dans l'environnement est le volcanisme dont les émissions dans l'atmosphère ont

été estimées entre 2800 et 8000 t/an (Loebenstein, 1994). Les feux de forêt, qui libèrent des formes d'arsenic accumulées dans les végétaux, et la volatilisation de l'arsenic, constituent de petites sources d'arsenic atmosphérique. L'arsenic peut également être libéré des minerais par l'érosion des roches et le lessivage des sols, et selon le microenvironnement physico-chimique et microbiologique, être solubilisé dans l'eau (Laperche et al., 2003) (Figure 2). Dans les zones géologiques riches en arsenic, les réserves souterraines d'eaux jouxtant les roches peuvent donc contenir de fortes concentrations de ce métalloïde. (Jones, 2007).



Milieu	Concentration	Sources
Air	< 4 ng/m ³	ATDSR 2007
Eaux douces	< 10 ng/L	ATDSR 2007, Molénat 2000
Mers	< 3µg/L	Molénat 2000
Eaux souterraines	< 10 à 5000 µg/L	Smedley et Kinniburg 2002
Sols	1 à 40 mg/kg (moyenne 5mg/kg)	BRGM 2004
Sédiments marins	< 15 mg/kg	Molénat 2000

Figure 2: Cycle géochimique simplifié de l'arsenic et concentrations dans les différents compartiments
Cycle géochimique établi d'après : Smedley et Kinniburg, 2002 ; Molénat et al., 2000 ; Laperche et al., 2003. Tableau établi d'après : INERIS, 2010 ; Smedley et Kinniburg, 2002. Concentration d'arsenic dans les eaux de boisson conseillée par l'OMS = 10 µg/L

1.2 SOURCES D'EXPOSITION ET UTILISATION DE L'ARSENIC (FIGURE 4)

La consommation de l'eau puisée au niveau des nappes phréatiques contaminées constitue la source principale d'exposition humaine à l'arsenic, et représente un problème de santé publique dans plusieurs régions du globe (Figure 3). Des niveaux importants d'arsenic dans les eaux ont été mesurés dans différents pays des continents américains, asiatiques et européens. Les régions présentant les nappes phréatiques les plus contaminées se trouvent aux USA, au Chili et en

Argentine, en Inde et surtout au Bangladesh. Dans ce pays, le nombre de personnes exposées de manière chronique à l'arsenic a été estimé entre 35 et 77 millions (Smith et al., 2000). L'origine de la consommation au Bangladesh d'eau contaminée par ce métalloïde remonte aux années 60. A cette époque, ce pays connaissait en effet une mortalité infantile importante causée principalement par des maladies comme le choléra ou la dysenterie. Or les bactéries responsables de ces pathologies sont majoritairement véhiculées par les eaux de surface qui étaient consommées par la population. Pour enrayer ce phénomène, les agences internationales ont fait installer des puits afin de puiser l'eau de boisson dans les nappes phréatiques, qui ne contiennent pas ces pathogènes. Cependant, les puits ayant été forés dans des zones géologiques riches en arsenic, l'eau prélevée contenait néanmoins des concentrations importantes d'arsenic comprises en moyenne entre 500 et 1000 $\mu\text{g/L}$, pour une concentration limite conseillée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) de 10 $\mu\text{g/L}$ (ATDSR, 2007). La consommation de ces eaux, issues de nappes phréatiques contaminées conduit à un empoisonnement chronique et massif à l'arsenic, décrit par l'OMS comme « le pire empoisonnement de l'histoire ». L'exposition chronique à l'arsenic est en effet responsable de nombreux effets sur la santé et d'une augmentation de la mortalité (Argos et al., 2010).



Figure 3 : Répartition mondiale des eaux souterraines contaminées par l'arsenic d'origine naturelle ou anthropique (Smedley et Kinniburgh, 2002)

Les sources géothermales peuvent également contaminer les eaux. Il a ainsi été estimé que les concentrations d'arsenic contenues dans ces sources excèdent souvent 1000 $\mu\text{g/L}$ dans le Parc national de Yellowstone aux USA (Welch et al., 2000). L'augmentation des concentrations d'arsenic dans les eaux de certaines régions du monde peut également résulter de l'activité humaine. Ceci est par exemple illustré par la Thaïlande, dont certaines réserves d'eaux ont été contaminées lors

d'exploitations minières intensives. En effet, l'activité minière actuelle ou passée contribue à la libération d'arsenic dans l'environnement. L'exploitation de sites miniers, provoque des brèches dans la roche qui exposent les minerais piégeant l'arsenic, à des réactions d'oxydo-réduction favorisant la formation d'espèces arséniées solubles dans l'eau (Laperche et al., 2003 ; Jones, 2007). Ces émissions contaminent les eaux de surfaces et les eaux souterraines voisines de l'exploitation. Des concentrations comprises jusqu'à 10 000 µg/L ont ainsi été mesurées dans des eaux souterraines voisines de mines. Les sols voisins peuvent aussi être contaminés par les eaux ou par le dépôt de poussières, comme à Ashanti au Ghana, où les sols proches d'une mine d'or avaient des teneurs en arsenic de 900 à 1290 mg/kg (Smedley et Kinniburgh, 2002).

L'activité industrielle contribue également à la libération d'arsenic dans l'environnement. Autrefois la majeure partie de l'arsenic anthropique provenait de la combustion de produits fossiles, comme le charbon, le pétrole ou les huiles, qui contiennent un pourcentage élevé d'arsenic ainsi que de l'émanation de fumées des industries productrices d'arsenic (Molénat et al., 2000). Dans le cas de pollution, les taux d'arsenic mesurés dans l'air autour d'industries émettrices peuvent aller jusqu'à 2000 ng/m³, alors que les taux ne dépassent pas 4 ng/m³ dans les régions rurales non polluées (ATDSR, 2007). L'arsenic, produit à 97% sous forme de trioxyde d'arsenic, est extrait de minerais dits arsénifères, contenant souvent du cuivre ou du plomb, dans les fonderies. Les minerais sont chauffés, ce qui provoque l'évaporation de l'arsenic et son oxydation dans l'air. Le métalloïde est ensuite recueilli sous forme de particules de trioxyde d'arsenic qui sont purifiées par grillage en présence de pyrite ou de galène (ATDSR, 2007 ; INERIS, 2010). Aujourd'hui, l'industrie métallurgique utilise de l'arsenic inorganique pour fabriquer des alliages, retrouvés par exemple dans les plombs de chasse où l'arsenic augmente la dureté du plomb, ainsi que dans les batteries, où l'alliage plomb-antimoine-arsenic augmente la résistance à la corrosion. L'arséniure de gallium est utilisé dans l'industrie de la microélectronique pour fabriquer des composés semi-conducteurs et des panneaux solaires (INERIS, 2010).

L'arsenic a également été utilisé par le passé de manière abondante dans l'agriculture. De nos jours, ces applications se sont raréfiées, suite à une prise de conscience collective de sa toxicité et de sa rémanence dans les sols. De la fin du 19^{ème} siècle à la première moitié du 20^{ème} siècle, l'arsenic a été utilisé de manière intensive dans l'agriculture en tant que pesticide. Des composés inorganiques, tels que l'arséniate de plomb ont été utilisés dans un premier temps, puis ont été progressivement remplacés dans les années 1950 par des composés organiques moins toxiques pour l'Homme, tels que le methylarséniate monosodique (MSMA) ou l'acide cacodylique. L'utilisation de la plupart de ces composés a été interdite aux USA en 2009, exception faite pour le MSMA, toujours employé dans les cultures de coton (ATDSR, 2007). En France, l'arsénite de sodium, le dernier pesticide

utilisé pour le traitement antifongique de la vigne, a été interdit en 2001 (Laperche et al., 2003). L'arsenic est également utilisé en tant qu'agent protecteur du bois, notamment sous forme d'arséniate de cuivre chromé (CCA). Cependant, son utilisation a été progressivement interdite dans plusieurs pays, dont la France dans les années 90. L'utilisation du CCA persiste aux USA, mais est toutefois bannie du domaine civil (ATDSR, 2007). Ces applications phytosanitaires passées ou actuelles ont favorisé l'accumulation d'arsenic dans les sols. En effet, le métalloïde est peu mobile et s'accumule facilement dans les sols non cultivés. La quantité d'arsenic présente dans les sols, après usages de pesticide, peut dépasser 290 mg/kg de terre. La limite recommandée est pourtant de 20 mg/kg de terre pour les utilisations agricoles afin d'éviter des pollutions trop importantes des sols (Molénat et al., 2000).

L'arsenic a été utilisé dans le domaine vétérinaire. Des dérivés organiques, tel que la roxarsone ($C_6H_6AsNO_6$) ont été utilisés dans l'élevage pour traiter les porcs et les volailles. La Roxarsone, utilisée dans 70% des aliments destinés aux poulets, permettait de traiter efficacement les animaux contre des parasites intestinaux, notamment les coccidies (Chapman et Johnson, 2002). Ce composé présentait également l'avantage de favoriser la croissance des poulets et d'apporter une teinte rosée à la chair. Ce produit a été interdit depuis 1999 par l'Union Européenne et a été retiré de la vente en 2011 par Pfizer, le fabricant, suite à la détection d'arsenic dans la viande malgré l'arrêt des traitements 5 jours avant l'abattage. En plus de contaminer la chaîne alimentaire, cette utilisation a également contribué à la pollution des sols. Les litières et les excréments issus des élevages ont en effet été utilisés comme engrais pour les cultures.

L'arsenic est également utilisé en thérapeutique humaine comme médicament antiparasitaire pour le traitement de la trypanosomiose, ou maladie du sommeil, et surtout comme médicament anticancéreux pour la prise en charge de la leucémie aigue promyélocytaire de type 3 (Voir II.3 Usage thérapeutiques de l'arsenic).

Du fait de sa présence ubiquitaire dans l'environnement, et de son cycle géochimique, la chaîne trophique peut être contaminée par l'arsenic à différents niveaux. L'alimentation constitue une source potentielle d'exposition principalement via la consommation de produits de la mer et de riz. Les formes d'arsenic présentes dans l'alimentation sont en général organiques. En effet, les formes inorganiques sont captées par les algues, premier maillon de la chaîne trophique, qui les transforment en composés organiques. Ces formes s'accumulent ensuite dans les animaux marins, sous forme de composés tels que l'arsénobétaïne, qui constitue jusqu'à 95% de l'arsenic total accumulé dans les poissons (Molénat et al., 2000) et l'arsenocholine, présent majoritairement dans les crevettes (EFSA, 2009). Ces composés organiques constituent cependant les espèces arséniées les moins toxiques. L'arsenic est également accumulé dans le riz cultivé sur des sols pollués par des traitements

phytosanitaires, comme dans certaines régions des USA. Les mesures de contamination des sols en arsenic, causée par ces traitements phytosanitaires, montrent des concentrations de métalloïde pouvant aller jusqu'à 625 mg/kg de terre (Molénat et al., 2000). L'utilisation d'eau contaminée lors de l'irrigation augmente également l'accumulation de ce métalloïde dans les plantations. Contrairement aux autres sources alimentaires, les formes d'arsenic retrouvées dans le riz sont principalement inorganiques. Des estimations ont en effet montré que les formes inorganiques comptent en moyenne pour 60% de l'arsenic total (Rahman et Hasegawa, 2011). Au Bangladesh, le riz étant un constituant majeur de l'alimentation, sa consommation peut représenter une source d'exposition non négligeable qui était largement méconnue jusqu'à présent. Elle s'ajoute à la consommation d'eau de boisson dans laquelle des concentrations très importantes sont fréquemment retrouvées dans ce pays. Enfin, l'arsenic est également retrouvé dans la fumée de cigarette, qui peut en contenir plus d'1 µg (ATDSR, 2007). Au total, les sources d'exposition de l'Homme à l'arsenic sont multiples (Figure 4) et l'apport moyen journalier en arsenic a ainsi été estimé à 150 µg/j dans une population vivant au Bangladesh (Ohno et al., 2007).

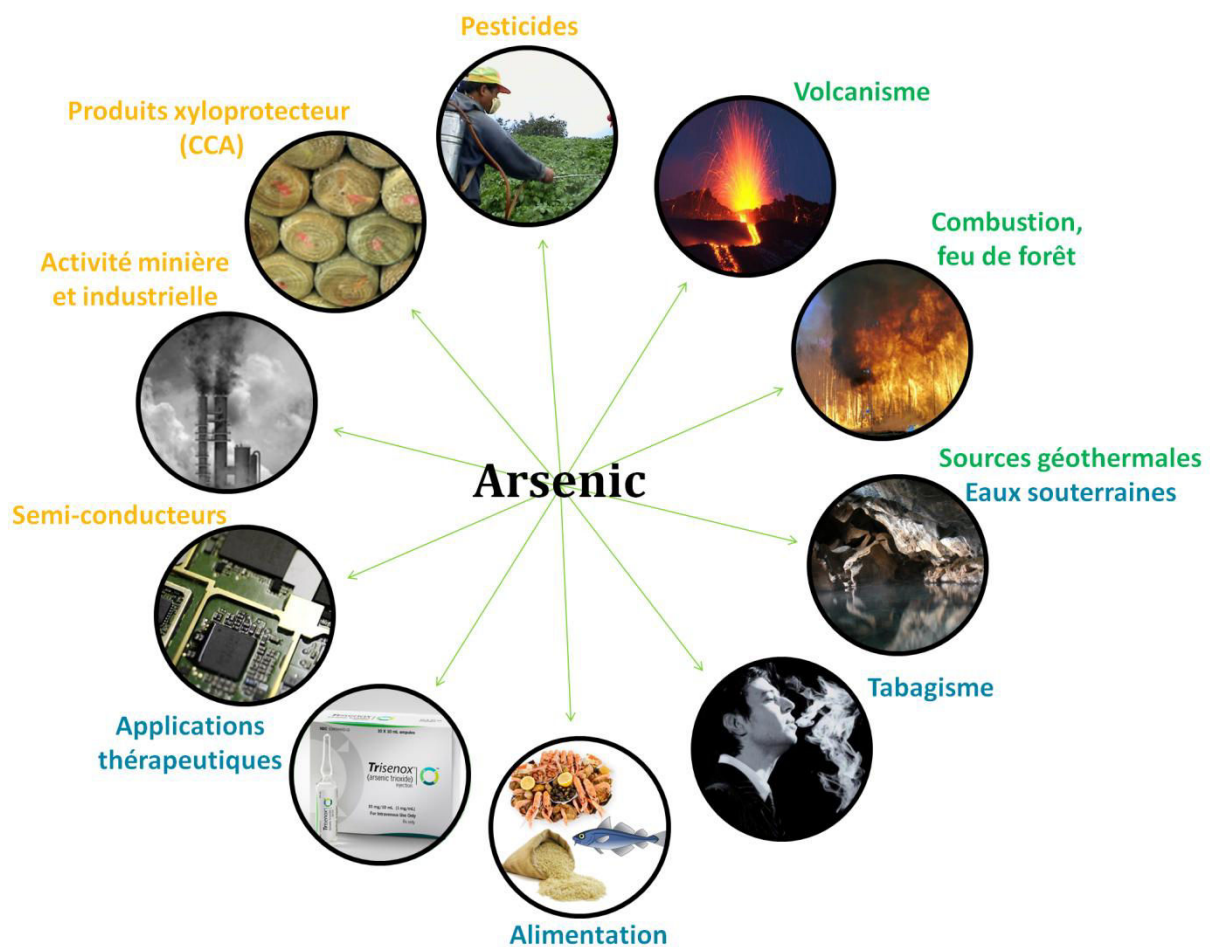


Figure 4 : Sources de libération et d'exposition humaine à l'arsenic
L'arsenic peut être libéré dans l'environnement de manière naturelle (en vert), ou suite à l'activité humaine (en orange).
L'Homme peut ensuite être exposé à l'arsenic ainsi libéré via plusieurs sources d'expositions (en bleu)

1.3 TOXICOCINÉTIQUE DE L'ARSENIC

1.3.1 Absorption

La nourriture représente la principale source d'apport de ce métalloïde, à l'exception des régions où l'eau de boisson est contaminée par l'arsenic. La voie orale constitue donc la voie majeure d'exposition chez l'homme. Près de 95% de l'arsenic ingéré seraient absorbés au niveau gastrointestinal, selon la nature des composés ingérés (Duker et al., 2005; Zheng et al., 2002). En effet, plus la solubilité des composés arséniés est importante, plus la proportion d'arsenic absorbé est conséquente. Plusieurs études montrent notamment une absorption rapide et presque complète des formes d'arsenic solubles comme l'arsénite qui est retrouvé dans l'eau de boisson ou le riz, mais une absorption presque nulle des formes insolubles, comme le trisélenide d'arsenic (As_2Se_3) (Schuhmacher-Wolz et al., 2009). Le substrat avec lequel est ingéré l'arsenic, comme les aliments, l'eau de boisson ou les sols, joue aussi sur sa biodisponibilité (INERIS, 2010).

L'inhalation constitue une seconde voie d'entrée possible de l'arsenic dans l'organisme. L'arsenic inhalé peut être sous forme gazeuse, mais il l'est principalement sous forme particulaire (Matschullat, 2000). L'absorption de l'arsenic après inhalation dépend, là encore, de la solubilité mais également de la taille des particules. La proportion d'arsenic absorbé par l'organisme a été estimée en moyenne entre 30 et 40% (ATDSR, 2007). De manière générale, les quantités d'arsenic inhalées sont minimales, sauf dans les régions polluées par les industries, lors d'exposition professionnelles, et dans le cas de tabagisme. Les fumeurs inhalent donc de l'arsenic, parmi les milliers de substances chimiques présentes dans la fumée de cigarette.

1.3.2 Distribution

Une fois absorbé, l'arsenic se lie fortement aux protéines plasmatiques, du fait de sa forte affinité pour les groupes sulfhydryles. Sa demi-vie sanguine est d'une heure environ, ce qui fait des mesures sanguines de mauvais indicateurs d'exposition chronique à l'arsenic (INERIS, 2010). Pendant les premières heures suivant l'absorption, les plus fortes concentrations sont retrouvées dans le foie et les reins. Par la suite, le métalloïde se distribue de manière relativement uniforme dans l'organisme, car il n'a pas d'organes cibles spécifiques. L'arsenic passe également la barrière placentaire, exposant le fœtus aux effets de ce toxique. Une fois dans les tissus, l'arsenic inorganique peut entrer dans les cellules de plusieurs manières : par diffusion simple ou par des systèmes de transport. Les formes trivalentes, reconnues en tant que polyols, peuvent pénétrer dans le milieu intracellulaire par des aquaglycéroporines (AQP), en particulier par AQP9 et AQP7, mais aussi par des transporteurs de sucres de types hexose (Yang et al., 2012). Les formes pentavalentes sont prises

en charge par des transporteurs au phosphate du fait de leur similitude structurale avec celle du phosphore (Yang et al., 2012). L'élimination de ces tissus est relativement rapide. Mais, deux à quatre semaines après l'arrêt de l'exposition à l'arsenic, des résidus d'arsenic trivalent sont retrouvés dans les tissus riches en kératines, tels que la peau, les cheveux et les ongles. L'arsénate est davantage détecté dans les os et les dents (Poëy et Philibert, 2000).

I.3.3 Métabolisme

Le foie est le site primaire du métabolisme de l'arsenic chez les mammifères, bien que certains composés soient également biotransformés dans d'autres tissus, tels que les reins ou les poumons. A ce jour, deux voies de métabolisme de l'arsenic ont été proposées, une voie classique et une voie alternative.

La voie classique correspond au métabolisme de l'arsenic par des réactions de méthylation et de réduction (Figure 5). Les étapes de réduction convertissent les formes pentavalentes en formes trivalentes, alors que les réactions de méthylation permettent la génération des composés monométhylés et diméthylés (Aposhian et al., 2004). Lorsque l'arsenic est absorbé sous une forme inorganique pentavalente (As(V)), la réaction de réduction d'As(V) en arsenic inorganique trivalent (As(III)) a lieu rapidement au niveau du sang et du foie. (INERIS, 2010). Cette réaction peut se faire de manière non enzymatique, avec le glutathion seul, ou de manière enzymatique lorsqu'elle est catalysée par la GSTO1-1 (glutathion-S-transférase de classe 1) (Schuhmacher-Wolz et al., 2009). As(III) subit ensuite une succession de méthylations oxydatives, principalement dans le foie, mais aussi dans d'autres sites, comme les testicules, les reins ou les poumons qui possèdent également cette activité (Cohen et al., 2006). Les méthylations oxydatives de l'arsenic trivalent (As(III)) en MMA(V) (méthylarsoniate) ainsi que du MMA(III) (méthylarsonite) en DMA(V) (diméthylarsinate) sont catalysées principalement par l'As(III)MT (Arsenic(III) méthyltransferase). Cette enzyme nécessite de la SAM (S-adenosylmethionine), comme donneur de groupe méthyl, et du NADPH (nicotinamide adenine dinucléotide phosphate) comme donneur d'électron.

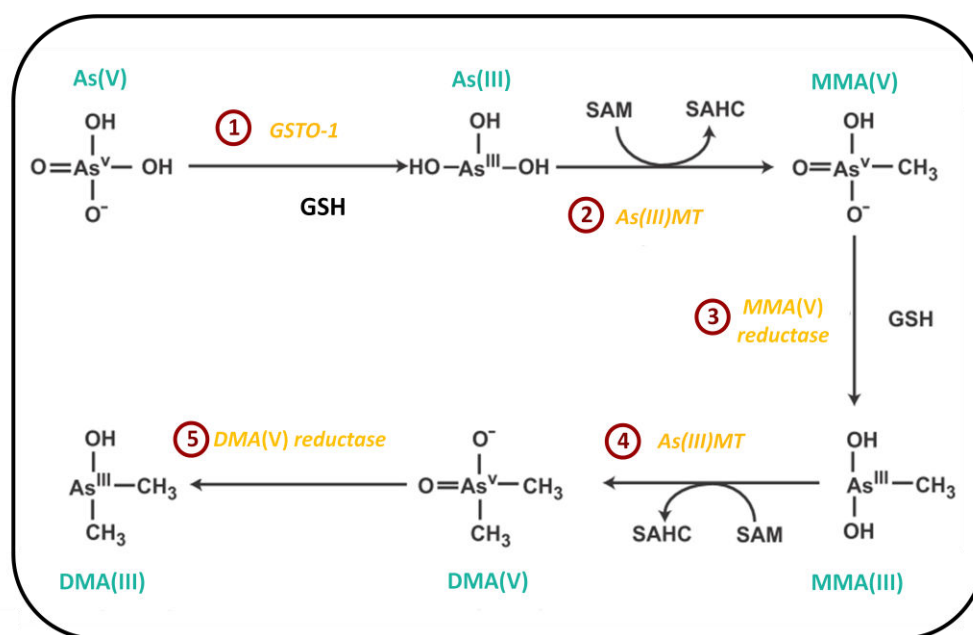


Figure 5 : Métabolisme de l'arsenic chez l'Homme

Adapté de Aposhian 2004. As(V) : arséniate ; As(III) : arsénite ; MMA(V) : méthylarsoniate ; MMA(III) : méthylarsonite ; DMA(V) : diméthylarsiniate ; DMA(III) : diméthylarsinite ; GSTO-1 : glutathion-S-transférase de classe 1 ; GSH : glutathion ; SAM : S-adenosylmethionine ; As(III)MT : arsenic(III) méthyltransferase

Une voie dite alternative du métabolisme de l'arsenic a également été décrite (Hayakawa et al., 2005). Au cours de ce processus, l'arsenic inorganique trivalent est métabolisé via la formation non enzymatique de complexes avec le glutathion, conduisant à la formation d'arsenic triglutathion.

Les réactions de méthylation sont soumises à des différences inter-espèces même si l'Homme et la plupart des animaux de laboratoire peuvent biométhyler l'arsenic. Cependant certains mammifères comme le marmouset, le chimpanzé, le cochon d'Inde présentent des quantités très faibles d'As(III)MT dans le foie. La biométhylation de l'arsenic est donc relativement faible dans ces organismes (ATDRS, 2007). Chez l'Homme, des facteurs tels que la dose, l'âge, le sexe ou des facteurs environnementaux comme le tabagisme, la consommation d'alcool et les habitudes alimentaires, contribuent aux larges variations inter-individuelles de méthylation observées chez l'Homme. De plus, les polymorphismes existant au niveau des méthyltransférases, mais également de la GSTO1-1, jouent très certainement un rôle prépondérant dans les différences inter-individuelles de biotransformation de l'arsenic et dans la susceptibilité des individus aux effets toxiques du métalloïde (Schuhmacher-Wolz et al., 2009).

Historiquement, la méthylation a été considérée comme un mécanisme de détoxification, la toxicité aiguë des formes organiques ayant été décrite initialement comme moins importante que celle des formes inorganiques. Cependant, une toxicité supérieure des formes méthylées trivalentes MMA(III) et DMA(III) à celle de l'arsenic trivalent inorganique a été observée plus récemment dans plusieurs modèles cellulaires (Styblo et al., 2000). Quelques études soutiennent notamment l'hypothèse selon laquelle les formes méthylées de l'arsenic pourraient induire la transformation

maligne de cellules humaines (Bredfeldt et al., 2006). Dans ce cadre, des études épidémiologiques ont également démontré qu'un fort pourcentage urinaire de la forme méthylée MMA peut être corrélé au développement de tumeurs cutanées, pulmonaires et de la vessie chez des individus exposés chroniquement à l'arsenic (Hall et Gamble, 2012).

1.3.4 Elimination

L'arsenic est rapidement excrété de l'organisme, principalement par la voie urinaire dans les 48h suivant l'exposition. Dans les urines, les différents métabolites sont retrouvés en proportions variables selon des individus, mais il est généralement mesurés les niveaux suivants : 10% à 30% d'arsenic inorganique, 10% à 20% de MMA et 60% à 80% de DMA, (Schuhmacher-Wolz et al., 2009) (Tableau 1). De fortes variations inter-individuelles existent cependant ; ainsi une étude a montré que l'excrétion de MMA est inférieure à 5% dans une population des Andes, alors qu'elle avoisine les 27% dans une population vivant à Taïwan (Schuhmacher-Wolz et al., 2009). Ces différences résultent probablement de polymorphismes génétiques modifiant largement les capacités de biométhylation de l'arsenic selon les populations. Les mécanismes d'efflux cellulaire de l'arsenic restent encore mal connus. Cependant, il est démontré que l'arsenic inorganique est éliminé des cellules principalement par les protéines de transport de type MRP (Multidrug Resistant Protein) appartenant à la famille des transporteurs « ATP-Binding Cassette (ABC) ». La forme inorganique trivalente peut être conjuguée au glutathion (GSH) puis effluée de la cellule par les protéines MRP1 et/ou MRP2 exprimées au niveau de la membrane plasmique (Leslie, 2012).

Study population	Arsenic in drinking water (µg/L)	Urinary content in µg/L (SD)				
		As ^{III}	MMA ^{III}	MMA ^V	DMA ^{III}	DMA ^V
India, West Bengal ^a	29.0	9.27 (4.0)	6.49 (0.9)	8.63 (4.3)	6.31 (3.1)	25.8 (14)
India, West Bengal ^a	55.0	11.2 (8.9)	7.44 (2.5)	10.3 (3.8)	16.8 (7.5)	31.5 (11)
India, West Bengal ^a	130.0	19.9 (15)	9.37 (2.9)	14.9 (5.2)	23.1 (9.6)	80.8 (45)
India, West Bengal ^a	163	22.9 (16)	11.9 (5.2)	28.5 (13)	32.2 (11)	171 (71)
China, Inner Mongolia ^b	510-660	43-111	32-137	21-64	21-38	37-161

Note: ^aMandal et al., 2004 (mean values).

^bLe et al., 2000 (data presented as range of four samples).

Tableau 1: Distribution urinaire de l'arsenic inorganique et de ses métabolites dans plusieurs populations (Schuhmacher-Woltz, 2009)

L'arsenic peut également être excrété dans le lait maternel. Une étude effectuée sur des femmes vivant dans les Andes et consommant une eau contenant en moyenne 200 µg/L d'arsenic inorganique montre des concentrations dans le lait maternel d'environ 3 µg/L (Concha et al., 1998). D'autres voies d'élimination minoritaires de l'arsenic existent, telles que l'élimination biliaire, les fèces, la sueur ou la desquamation de la peau. Lors d'expositions chroniques, une petite quantité d'arsenic peut être stockée dans l'épiderme, les cheveux et les ongles. Ces tissus sont riches en kératine, une

protéine soufrée, pour laquelle l'arsenic inorganique trivalent a beaucoup d'affinité. L'arsenic accumulé dans ces tissus est éliminé plus lentement dans les semaines ou les mois qui suivent (ATDSR, 2007).

I.4 BASES MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DES EFFETS DE L'ARSENIC

I.4.1 Caractère thioloprive

L'arsenic présente un caractère thioloprive, c'est-à-dire que ses composés trivalents ont une forte affinité pour les fonctions thiols, ou $-SH$ avec lesquelles le métalloïde peut se complexer de façon stable (Styblo et al., 2000). Les protéines porteuses de résidus cystéines sont donc des cibles privilégiées de l'arsenic. Il a ainsi été décrit que l'arsenic pouvait inhiber 200 enzymes différentes, en particulier celles impliquées dans les voies du métabolisme énergétique de la cellule et dans la synthèse et la réparation de l'ADN (Ratnaïke, 2003). Cette interaction avec les fonctions thiols des cystéines favorise un déséquilibre du statut redox, fréquemment observé lors des expositions à l'arsenic, et des altérations des voies de signalisation contrôlant l'expression génique dans la cellule. Ces événements biochimiques favorisent des modifications durables de fonctions cellulaires clés et peuvent aboutir à la mort cellulaire (Hughes, 2002).

I.4.2 Adaptation cellulaire à l'arsenic

I.4.2.1 Altération du statut redox

Du fait de son caractère thioloprive, l'arsenic peut perturber le statut redox de la cellule, causant un stress oxydant. Le stress oxydant peut être défini comme une rupture de l'équilibre de la balance entre systèmes anti-oxydants et pro-oxydants, en faveur des systèmes pro-oxydants (Figure 6). Cette rupture de l'équilibre peut résulter d'une répression des systèmes protecteurs anti-oxydants de la cellule ou d'une augmentation de la concentration des molécules pro-oxydantes, telles que les espèces réactives de l'oxygène (EAO) ; ces deux événements sont intimement liés et mutuellement influençables (Davies, 2000).

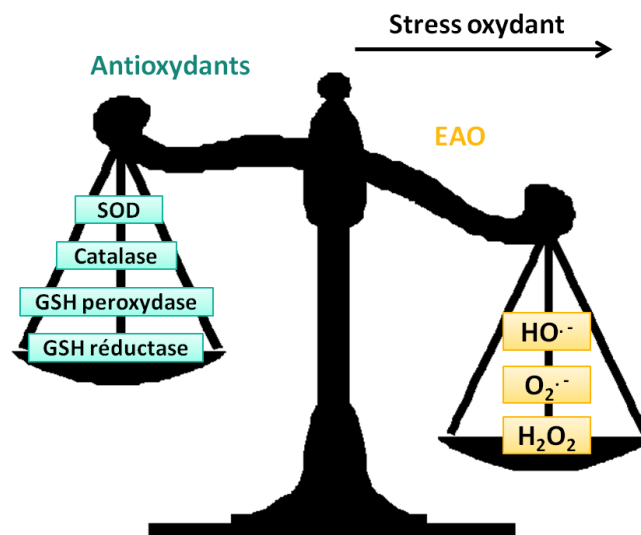


Figure 6 : Balance entre pro-oxydants et antioxydants présente dans la cellule

Les EAO regroupent les espèces radicalaires (anion superoxyde et radical hydroxyl) ou non radicalaires (peroxyde d'hydrogène) de l'oxygène qui ont en commun le fait de présenter une forte réactivité vis-à-vis des molécules biologiques. Lorsqu'elles sont produites en faibles concentrations, les EAO peuvent stimuler ou inhiber certaines voies de signalisation cellulaires sensibles aux variations du statut redox et finalement modifier des fonctions cellulaires majeures comme la prolifération ou la différenciation (Brieger et al., 2012). En revanche, de fortes concentrations d'EAO sont délétères pour la cellule et endommagent la structure de protéines intracellulaires en induisant la peroxydation des membranes et favorisent des cassures de brins d'ADN. Ces niveaux élevés d'EAO sont généralement à l'origine de processus de mort cellulaire par nécrose ou apoptose.

La production d'EAO peut être augmentée lors de l'exposition à de nombreux facteurs exogènes, tels que des radiations, des polluants environnementaux dont l'arsenic, des médicaments, des agents biologiques, ou le tabac. Les origines des EAO sont multiples. Elles peuvent être produites par la mitochondrie, les peroxysomes, le réticulum endoplasmique ainsi que par des systèmes enzymatiques comme la NADPH oxydase ou les cytochromes P450 (Gupta et al., 2012). L'induction des EAO par l'arsenic a été démontrée dans de très nombreux modèles cellulaires incluant les cellules leucémiques promyélocytaires, les kératinocytes, les cellules endothéliales vasculaires, les cellules musculaires lisses vasculaires, les lymphocytes ou les macrophages (Kitchin, 2001). Cette production d'EAO semble dépendre de plusieurs paramètres, tels que la dose, le type cellulaire ainsi que le temps d'exposition. Les mécanismes par lesquels l'arsenic génère des EAO semblent cependant très variés et encore imparfaitement identifiés (Figure 7).

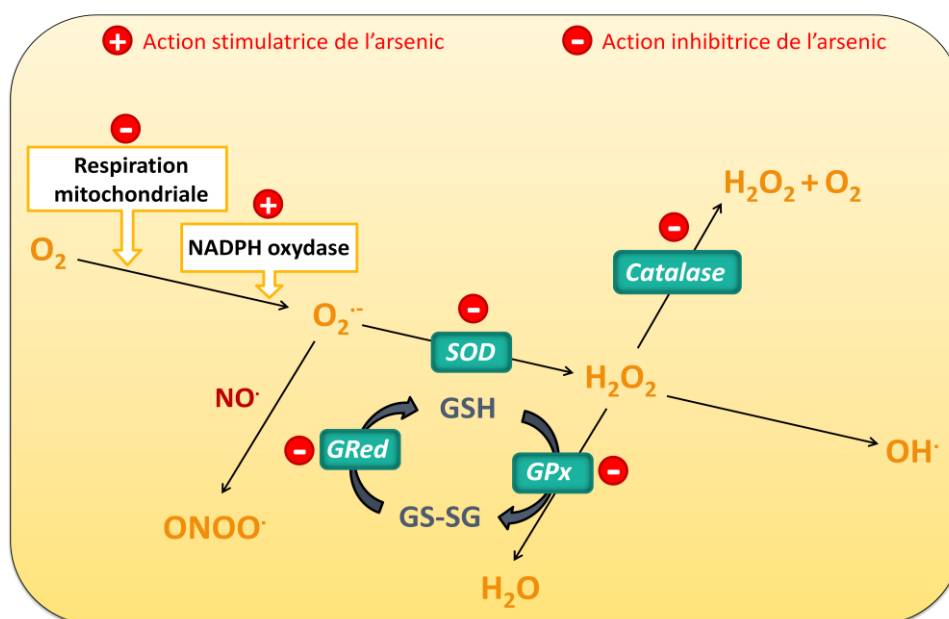


Figure 7 : Impact de l'arsenic sur la génération des EAO et sur les systèmes anti-oxydants associés au glutathion
 GPx : Glutathion Peroxydase ; GRed : Glutathion Reductase ; GSH : Glutathion ; GS-SG : Glutathion Disulfure ; H_2O_2 : Peroxyde d'Hydrogène ; NO^{\cdot} : Monoxyde d'azote ; $O_2^{\cdot -}$: anion superoxyde ; $ONOO^{\cdot}$: Peroxynitrite ; OH^{\cdot} : radical hydroxyle ; SOD : Superoxyde Dismutase

L'arsenic pourrait générer des EAO en altérant le fonctionnement de la chaîne de transfert des électrons au sein de la mitochondrie. En particulier, il peut augmenter la formation d'anions superoxyde en induisant le transfert d'électrons sur l'oxygène moléculaire en inhibant la respiration mitochondriale, notamment dans des cellules leucémiques humaines exposées à de fortes concentrations de métalloïde (Pelicano et al., 2003). L'arsenic peut également générer des EAO en stimulant l'activité de la NADPH oxydase dans la lignée cellulaire promyélocytaire NB4, dans la lignée monocytaires U937, mais également dans le macrophage en culture primaire (Chou et al., 2004; Lemarie et al., 2008). Le rôle de cette enzyme est en effet de générer des quantités importantes d'anion superoxyde, dont les effets cytotoxiques permettent notamment de détruire les agents pathogènes phagocytés par le macrophage.

L'arsenic pourrait également induire la génération d'EAO en inhibant différents systèmes anti-oxydants de nature non enzymatiques et enzymatiques. Ces systèmes jouent un rôle fondamental dans l'élimination de ces composés très réactifs ainsi que dans la réparation des dommages cellulaires induits. Parmi les systèmes non enzymatiques, le GSH tient un rôle majeur. Le GSH est un tripeptide (γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine), contenant un groupement thiol, présent dans la cellule à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Du fait de ses propriétés réductrices, c'est un acteur clé dans le maintien du potentiel redox de la cellule. Il intervient également dans la détoxification des xénobiotiques, composés souvent électrophiles, qui peuvent être à l'origine d'un stress oxydant (Lu, 2013). Le GSH peut former des conjugués avec de nombreux xénobiotiques de manière spontanée ou catalysée par les GS-SG-transférases (Lu, 2009). Du fait de son affinité pour le

groupement thiol, l'arsenic peut diminuer significativement les concentrations intracellulaires de GSH en se complexant avec la fonction thiol de son résidu cystéine. Cette interaction réduit les activités anti-oxydantes du glutathion, favorise un déséquilibre de la balance pro-oxydants/anti-oxydants, et finalement favorise la production d'EAO. En effet, le GSH permet notamment la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O , en association avec la glutathion peroxidase (GPx). Il intervient également dans la réduction d'espèces réactives, tel que les peroxydes organiques, en association avec l'activité de la GSH réductase (GRed) et de la GPx. L'ensemble des activités réductrices produit la forme oxydée du glutathion (GSSG). La forme réduite active est régénérée par la GRed qui est la principale enzyme contrôlant le cycle rédox du GSH (Lu, 2009). L'arsenic cible également certains mécanismes antioxydants enzymatiques de la cellule. Le métalloïde inhibe en effet l'activité de la GPx et de la GRed, perturbant ainsi les fonctions anti-oxydantes du GSH mais plus généralement celles de la cellule (Jing et al., 1999). De même, une exposition chronique à l'arsenic a été associée avec une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase, enzymes impliquées dans la transformation et la neutralisation des EAO (Figure 7) (Flora, 2011).

D'autres enzymes sont impliquées dans le maintien du statut redox, notamment celles contrôlant la synthèse du GSH. Ce composé est synthétisé en deux étapes : la γ -glutamylcystéine est d'abord synthétisée par la Glutamate Cystéine Ligase (GCL). Lors d'une deuxième étape, la glycine est ajoutée à l'extrémité C-terminale par la Glutathion synthétase (GS). La première étape catalysée par la GCL constitue l'étape limitante de la synthèse du GSH. Elle joue donc un rôle capital dans le maintien des stocks intracellulaires de GSH. La GCL est formée de deux sous-unités : une sous-unité catalytique, GCLC possédant l'activité enzymatique, et la sous-unité régulatrice, GCLM, qui favorise la réaction enzymatique en abaissant le K_m de la GCLC pour le glutamate (Lu, 2009). L'expression de ces deux enzymes est induite lors d'un stress oxydant intracellulaire. L'enzyme NQO1 (NADPH quinone oxydo réductase 1), qui appartient à la catégorie des enzymes de biotransformation de phase 1, participe également au maintien de l'équilibre rédox de la cellule. NQO1 est ainsi capable de catalyser la réduction des quinones en hydroquinone, comme c'est le cas lors du métabolisme du benzène. Cette activité enzymatique est cytoprotectrice, car elle s'oppose à la production des intermédiaires radicalaires semiquinones (Q^\cdot et QH^\cdot) catalysés notamment par les myéloperoxydase ou certains cytochromes P450. L'expression de NQO1 est également inductible par de nombreux composés pro-oxydants tels que l'arsenic. Enfin, l'hème oxygénase (HO-1) est une enzyme cytoprotectrice qui, en catalysant la dégradation de l'hème, génère des composés antioxydants (Kikuchi et al., 2005). L'expression de HO-1 est très fortement induite par l'arsenic inorganique dans la très grande majorité des modèles cellulaires étudiés.

Le caractère thioloprive de l'arsenic module l'activité de certains récepteurs et de diverses voies de signalisation sensibles aux variations de statut redox, notamment celles des MAP-kinases (Mitogen Activating Protein Kinases).

Concernant les récepteurs, des études ont démontré que de fortes concentrations d'arsenic inhibent l'activité du récepteur aux glucocorticoïdes. Cette inhibition résulterait de l'interaction du métalloïde avec un résidu cystéine dans la région portant le site fixation du ligand. Cette interaction réprime la liaison du ligand à son récepteur et inhibe donc la signalisation induite en aval (Stancato et al., 1993).

Les MAP-Kinases sont une famille de sérine-thréonine kinases impliquées dans la régulation d'effets biologiques extrêmement variés, tels que l'apoptose, la différenciation, la prolifération et la transformation cellulaire. Cette famille comporte trois classes majeures de MAP-Kinases : les kinases ERK (Extracellular signal Regulated Kinase), JNKs (c-Jun N-Terminal Kinase) /SAPKs (Stress Activated Protein Kinase) et p38-kinase. L'activité biologique de ces trois classes de kinases, principalement contrôlée par leur niveau de phosphorylation, varie selon les types cellulaires. Cependant, la voie ERK est de manière générale impliquée dans la différenciation cellulaire induite par les facteurs de croissance, ainsi que dans la prolifération et la transformation. Les voies JNK et p38 contrôlent davantage la réponse cellulaire induite par des cytokines ou des facteurs de stress, ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Bode et Dong, 2002). Ces MAP-Kinases sont activées par des MAPK-Kinases (MAPKK), elles même activées par des MAPK-Kinase-Kinases (MAPKKK).

L'arsenic inorganique peut moduler différemment l'activité des ces trois MAP-Kinases selon la dose à laquelle il est utilisé, le type cellulaire, son état de valence, et le temps d'exposition. Ainsi, pour des doses identiques, l'arsenic induit la phosphorylation de ERK 1/2 dans des cellules épithéliales bronchiques, mais pas dans la lignée cellulaire K652 (Shim et al., 2002; Wu et al., 1999). L'activation de la voie ERK a été observée dans la lignée de cellules épithéliales de souris JB6 pour des doses comprises entre 3,2 μ M et 50 μ M, mais ces concentrations sont sans effet sur la voie JNK (Huang et al., 1999). La valence de l'arsenic conditionne également l'activation des MAP-Kinases. Ainsi pour une dose identique de 50 μ M, As(III) active plus fortement JNK que As(V) dans la lignée JB6 (Huang et al., 1999). Plusieurs mécanismes d'activation de la voie des MAP-Kinases par l'arsenic ont été proposés ; cependant le mécanisme moléculaire principal est indirect et implique l'inhibition des phosphatases réprimant l'activité des MAP-Kinases. L'arsenic pourrait bloquer l'activité de ces phosphatases en oxydant des groupements thiols dans les sites catalytiques (Cavigelli et al., 1996).

1.4.2.3 Facteurs de transcription

L'arsenic peut également agir sur des facteurs de transcription sensibles au statut redox de la cellule, tels que les facteurs NF- κ B, Sp1 et AP1.

Sp1 (Specific Protein 1) est un facteur de transcription contenant de nombreux résidus cystéines et impliqué dans des processus cellulaires variés tels que la différenciation, la croissance, l'apoptose, la réponse à des dommages à l'ADN et l'expression de cytokines. L'activité transcriptionnelle de Sp1 est optimale lorsque ce facteur de transcription se trouve à l'état réduit. Il peut ainsi induire l'expression génique en s'associant avec des éléments coactivateurs tels que CRSP (Cofactor Required for Sp1 Activation (Safe et Abdelrahim, 2005). Il a été démontré que l'arsenic peut inhiber l'activité transcriptionnelle de Sp1, dans les cellules leucémiques NB4 exposées chroniquement à la dose de 0,75 μ M, en oxydant spécifiquement des résidus cystéines au sein de cette protéine (Chou et al., 2001).

AP1 (Activator Protein 1) est un facteur de transcription composé de protéines de la famille Jun (c-Jun, JunB, JunD..) et Fos (c-Fos, FosB...). Les homodimères de protéines Jun ou les hétérodimères formés par les protéines Jun et Fos se fixent sur les éléments de réponse TRE (TPA Response Element) et CRE (cAMP Response Element). Les gènes régulés par AP1 sont impliqués dans la différenciation, la prolifération ou l'apoptose. Leur induction passe par la voie des MAP-Kinases, et s'exerce en réponse à des stimuli variés tels que des facteurs de croissance, des cytokines ou des facteurs de stress. Des travaux ont en effet montré une régulation redox de ce facteur de transcription. Ainsi AP-1 présente une activité de liaison à l'ADN exacerbée dans des cellules pulmonaires de rats exposée à l'arsenic ou *in vitro* dans des cellules HeLa traitées avec le métalloïde (Cavigelli et al., 1996; Wijeweera et al., 2001). De plus, l'arsenic induit l'expression des sous-unités c-fos et c-jun pour des doses allant de 0,1 μ M à 5 μ M. Ces effets sont associés à l'activation de JNK qui favorise l'activité transcriptionnelle d'AP1 (Hughes, 2002).

La famille des facteurs de transcription NF- κ B comprend plusieurs membres s'associant en hétérodimères, le plus commun étant le dimère composé des sous-unités p65 et p50. Une des caractéristiques de la voie NF- κ B réside en sa capacité à être activée de façon post-traductionnelle. En l'absence de stimuli, les dimères NF- κ B sont en effet retenus dans le cytoplasme par une interaction avec la protéine I κ B, leur répresseur. Lorsque la voie est activée, I κ B est phosphorylé par des kinases IKK (I κ B kinase) puis est dégradé par le protéasome. Le dimère NF- κ B transloque alors dans le noyau, puis se fixe sur ses éléments de réponse κ B et s'associe avec le coactivateur CBP (CREB Binding Protein) /p300. Les gènes induits sont impliqués dans divers processus biologiques tels que la survie cellulaire ou la réponse immunitaire. NF- κ B joue en effet un rôle majeur dans l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. L'arsenic module également cette voie de

signalisation mais ses effets sont contradictoires selon le modèle cellulaire et la dose utilisés. De faibles doses de métalloïde peuvent aussi bien activer qu'inhiber l'activité de NF- κ B, alors que de fortes concentrations induisent plus généralement une inhibition du facteur de transcription (Brigelius-Flohé et Flohé, 2011). Cette répression de l'activité de NF- κ B, induite par de fortes doses d'arsenic, peut résulter de l'inhibition directe de la kinase IKK β par le métalloïde. En effet, l'arsenic peut se complexer avec des groupements thiols de résidus cystéines au sein d'IKK β et ainsi inhiber l'activité de cette kinase (Brigelius-Flohé et Flohé, 2011). De plus, l'arsenic peut également moduler le statut redox des sous-unités p50 et p65 qui ne sont fonctionnelles que lorsqu'elles se trouvent dans un état réduit.

Enfin, l'altération du statut redox induit également l'activation du facteur de transcription Nrf2 qui est un acteur central dans l'adaptation de la cellule au stress oxydant.

1.4.3 La voie de signalisation Nrf2

1.4.3.1 Fonctions biologiques de Nrf2

Le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor Erythroid 2 (NF-E2) related transcription factor), identifié pour la première fois par Moi et collaborateurs (Moi et al., 1994) joue un rôle majeur dans la réponse cellulaire au stress oxydant. Ce facteur de transcription de type bZip (basic Leucine Zipper), c'est-à-dire possédant un domaine de liaison à l'ADN en glissière à leucine, régule en effet un ensemble de gènes antioxydants. Ces gènes sont principalement impliqués dans le contrôle de l'homéostasie redox intracellulaire, dans la protection cellulaire contre le stress oxydant d'origine endogène ou exogène, et dans la réparation des dommages causés par un tel stress. Ils contrôlent l'expression d'enzymes i) neutralisant les EAO, telles que HO-1, la catalase ou la SOD, ii) biotransformant et éliminant les xénobiotiques de la cellule, comme certaines GGSH S-transférases ou la protéine de transport MRP2, iii) contrôlant la synthèse du GSH (GCLC et GCLM) et la réduction de groupements thiols oxydés (Thiorédoxine réductase), iv) assurant la réduction de métabolites électrophiles réactifs (NQO1) et v) impliquées dans la réparation de l'ADN, en particulier dans le processus NER (Nucleotide Excision Repair) (Brigelius-Flohé et Flohé, 2011).

L'étude du phénotype des souris Nrf2^{-/-} a permis de confirmer les fonctions biologiques de Nrf2 entrevues par la nature de ses gènes cibles. En effet, ces souris sont viables et parviennent à l'âge adulte. Cependant, elles présentent une susceptibilité accrue à différents facteurs de stress. Il a ainsi été montré que les souris Nrf2^{-/-} sont plus sensibles au stress chimique, comme en témoigne plusieurs études montrant une toxicité exacerbée de plusieurs xénobiotiques chez ces souris. L'hépatotoxicité induite par le paracétamol est augmentée (Enomoto et al., 2001; Goldring et al., 2004), de même que

la toxicité pulmonaire induite par le butyl-hydroxytoluène (Chan et Kan, 1999), et l'inflammation intestinale provoquée par des traitements au DSS (Dextran Sulfate Sodium) (Osburn et al., 2007). Les souris Nrf2^{-/-} présentent également une mortalité plus importante suite au choc endotoxinique induit par le LPS (Lipopolysaccharide) (Thimmulappa et al., 2006). De plus les effets cancérogènes de certaines substances sont exacerbés dans ces modèles, comme la cancérogénécité gastrique du B(a)P (Benzo(a)pyrène) (Bryan et al., 2013 ;Ramos-Gomez et al., 2001). L'ensemble de ces conséquences chez les souris déficientes en Nrf2 confirme le rôle majeur de Nrf2 dans la cytoprotection contre le stress oxydant induit notamment par les xénobiotiques.

1.4.3.2 Activation de la voie Nrf2 (Figure 8)

A l'état quiescent, Nrf2 est séquestré dans le cytosol par sa protéine inhibitrice, la protéine Keap1 (Kelch associated protein 1). Cette protéine, associée en homodimère, interagit avec Nrf2 et permet l'ubiquitination constante de Nrf2 qui est alors dégradée par le protéasome 26S. Ainsi à l'état basal, les niveaux cytoplasmiques de Nrf2 sont très bas. Sa demi-vie dans le cytoplasme est estimée entre 10 et 20 min dans les cellules de mammifères, et varie selon le type cellulaire (Bryan et al., 2013). Keap1 verrouille Nrf2 dans une conformation stable qui facilite son ubiquitination par l'enzyme Cul3 (Cullin based E3 ligase), une ubiquitine ligase interagissant avec Keap1. De plus, Keap1 joue le rôle de senseur de stress oxydant. En effet, cette protéine contient 27 résidus cystéine chez l'Homme, dont 9 hautement réactifs. Leur oxydation induit des changements conformationnels de Keap1 aboutissant à l'activation de la voie Nrf2 (Brigelius-Flohé et Flohé, 2011). Dans ce cadre, il est démontré que des composés électrophiles oxydent certaines cystéines clés de la protéine Keap1, en particulier la cystéine 151. Cette oxydation des groupements thiols perturbe l'interaction entre Cul3 et Keap1 et bloque l'ubiquitination de Nrf2. L'oxydation d'autres cystéines de Keap1, notamment les cystéines 273 et 288, favorisent la dissociation de Nrf2 de Keap1 (Brigelius-Flohé et Flohé, 2011). Une fois dissociée, la protéine Nrf2 subit des modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations par les isoformes atypiques de la famille des PKC (Protéine Kinase C) (PKC δ et PKC ι), qui peuvent être activées en réponse à un stress oxydant (Bryan et al., 2013). Ces modifications facilitent la translocation nucléaire de Nrf2 en inhibant sa réassociation avec Keap1 (Bloom et Jaiswal, 2003; Huang et al., 2002). Une fois présent dans le noyau, Nrf2 se dimérise avec des protéines porteuses des domaines bZip, ses partenaires principaux étant les petites protéines Maf (Musculo-Aponeurotic Fibrosarcoma). L'hétérodimère formé se fixe alors sur ses éléments de réponse de type ARE (Antioxydant Responsive Element), nommé également EpRE (Electrophile Responsive Element), et recrute le coactivateur CBP/p300 (Bryan et al., 2013), afin d'initier la transcription de ses gènes cibles.

Différents mécanismes moléculaires permettent de stopper l'activité transcriptionnelle de Nrf2. Ainsi, la translocation nucléaire de la kinase Fyn est observée quelques heures après l'activation de Nrf2. Cette kinase phosphoryle Nrf2 sur la tyrosine 568, ce qui favorise l'interaction de Nrf2 avec Crm1 (Chromosomal Maintenance 1), une exportine permettant la sortie nucléaire de Nrf2 et sa réassociation avec Keap1. L'accumulation nucléaire de la kinase Fyn est induite par la kinase GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase) (Jain et Jaiswal, 2007).

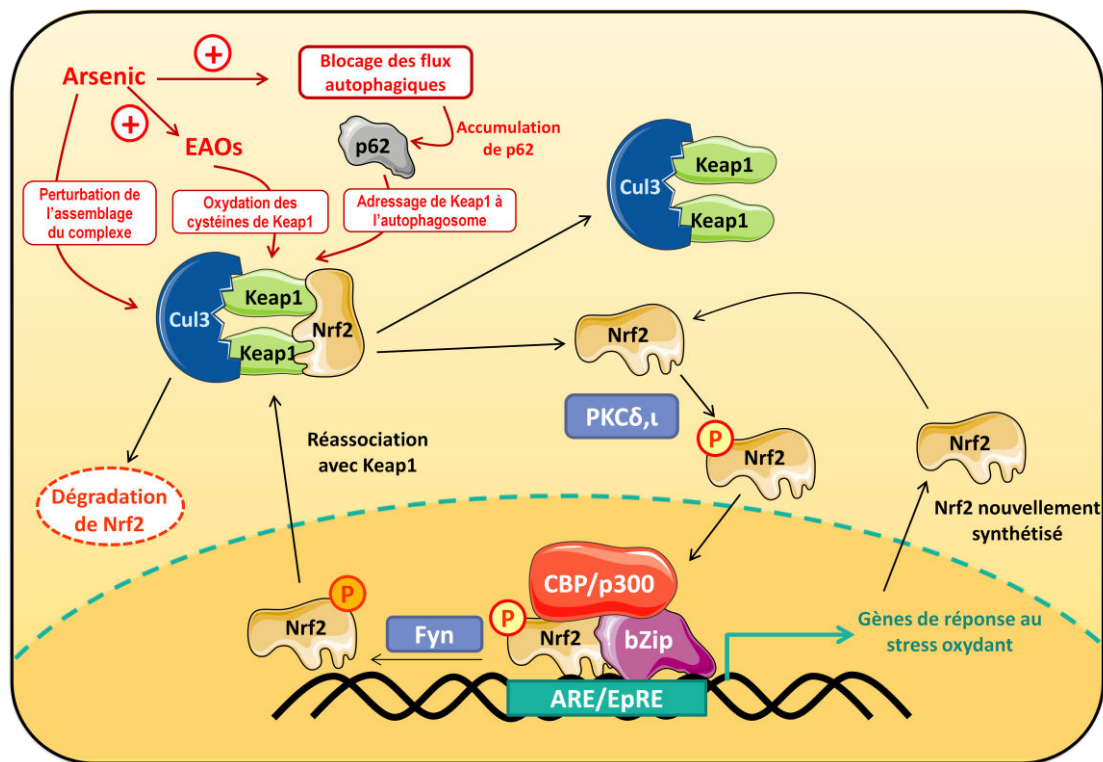


Figure 8 : Voie de signalisation Nrf2 et hypothèses d'activation par l'arsenic
D'après : Lau et al., 2013; Brigelius-Flohé et Flohé, 2011; Wang et al., 2008

1.4.3.3 Régulation transcriptionnelle de Nrf2

Comme discuté précédemment, la voie Nrf2 est régulée de manière importante par des modifications post-traductionnelles. Cependant, des régulations transcriptionnelles modulent également cette voie de signalisation. Ainsi la présence d'éléments de réponse ARE dans le promoteur de Nrf2 montre la capacité de cette protéine à réguler sa propre transcription, créant ainsi une boucle d'amplification suite à la survenue d'un stress oxydant. La protéine Nrf2 nouvellement synthétisée ne s'associerait pas avec Keap1, mais transloquerait directement au noyau pour induire la transcription de ses gènes cibles (Brigelius-Flohé et Flohé, 2011). Le promoteur de Nrf2 présente également des éléments de réponse κ B, permettant l'expression de Nrf2 en réponse à l'activation de la voie NF- κ B. Ceci est particulièrement illustré par l'augmentation des niveaux d'ARNm de Nrf2 en réponse à une stimulation au LPS, connu pour activer la voie NF- κ B (Rushworth et al., 2012).

1.4.3.4 Activation et modulation de l'activité de la voie Nrf2 par l'arsenic

Les mécanismes d'activation de la voie Nrf2 par l'arsenic ne sont pas encore totalement élucidés. L'arsenic pourrait agir de manière indirecte via la génération d'EAO qui activeraient la voie de signalisation Nrf2. Cependant, des données expérimentales montrent qu'une induction des gènes de réponse au stress régulés par Nrf2, tels que NQO1 ou HMOX1 (gène codant pour HO-1), est possible en l'absence d'EAO dans les cellules exposées au métalloïde (Morales et al., 2009) ; ceci suggère donc l'existence d'une voie d'activation directe de Nrf2 par l'arsenic. Les effets de l'arsenic ne semblent pas passer par l'oxydation de la cystéine 151 clé de Keap1, comme pour la plupart des inducteurs classiques de la voie Nrf2, tel que le tBHQ (tert Butylhydroquinone)(Wang et al., 2008). Des travaux ont en effet démontré que l'arsenic perturberait davantage la dynamique d'assemblage du complexe Keap1-Cul3, ce qui empêcherait son activité ubiquitine ligase (Wang et al., 2008). Une étude récente montre de plus que l'arsenic pourrait activer Nrf2 en altérant les processus d'autophagie (Lau et al., 2013a). L'autophagie est un mécanisme cellulaire jouant un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, ainsi que dans l'élimination des protéines ou des organelles endommagées. L'adressage aux autophagosomes des éléments à dégrader est contrôlé par la protéine p62 (ou SQSTM- 1, séquestosome 1)(Ichimura et al., 2008). Il a été démontré récemment que p62 entre en compétition avec Nrf2 pour se lier spécifiquement à Keap1 (Copples et al., 2010; Komatsu et al., 2010). Cette compétition favorise la libération de Nrf2 qui n'est alors plus dégradé. L'arsenic altérerait les flux autophagiques constitutifs de la cellule, permettant l'accumulation cytoplasmique de la protéine p62, son association à Keap1 et finalement la libération et/ou l'activation de Nrf2 (Lau et al., 2013a).

L'arsenic est un métalloïde induisant un stress intracellulaire propice à la modulation de nombreuses voies de signalisation et à la modulation d'un grand nombre de gènes. Cependant les effets de l'arsenic génèrent également une réponse au stress contrôlée par Nrf2 et aboutissant à l'expression de nombreux autres gènes codant pour des protéines antioxydantes. L'ensemble de ces mécanismes moléculaires est à l'origine des effets toxiques du métalloïde et crée un cadre propice à la survenue de pathologies chez les individus exposés.

II. TOXICITE DE L'ARSENIC CHEZ L'HOMME

II.1 TOXICITÉ AIGUE

II.1.1 Symptômes cliniques d'une intoxication aigue

L'arsenic est particulièrement connu pour son usage en tant que poison. En effet, jusqu'au 19^{ème} siècle, le « roi des poisons et le poison des rois » a été utilisé de manière très fréquente notamment par des membres de la classe dirigeante. En Europe, les familles les plus célèbres, pour leur usage de l'arsenic à des fins d'empoisonnements, étaient les familles Borgia et de Medicis. L'arsenic était à cette époque un poison très populaire, du fait de son absence de goût et d'odeur, ce qui le rendait indétectable dans la boisson et la nourriture. De plus, les signes les plus visibles d'un empoisonnement aigu à l'arsenic étaient facilement confondus avec d'autres maladies couramment répandue à l'époque, telle que les infections gastro-intestinales (ATDSR, 2007). Lors d'une intoxication aiguë à l'arsenic par ingestion, les premiers symptômes observés sont en effet de type gastro-intestinaux. Ils surviennent quelques heures après l'ingestion d'une forte dose d'arsenic, et comprennent des douleurs abdominales importantes associées à des hémorragies, ainsi que des vomissements et des diarrhées (choléra arsénical). Du fait de la perte importante de fluides, l'intoxication peut s'accompagner d'une insuffisance vasculaire pouvant menacer le pronostic vital (ATDSR, 2007). D'autres effets sont ensuite observés, de nature neurologique (encéphalopathie aiguë), respiratoire (syndrome de détresse respiratoire aiguë, œdème pulmonaire), ainsi que des crampes musculaires ou des anomalies cardiaques. L'individu peut également être sujet à des convulsions, des paralysies, ou un coma. Le décès de la personne intoxiquée peut s'ensuivre très rapidement, suite à la défaillance multi-organique induite par le poison (Mead, 2005). En cas de survie de la personne intoxiquée, d'autres signes peuvent apparaître plus tardivement dans les jours ou les semaines qui suivent. Des atteintes neurologiques, comme des neuropathies périphériques, peuvent se développer en une à trois semaines après l'intoxication suite à une dégénérescence axonale. Elles peuvent être accompagnées de troubles psychologiques comme des modifications de la personnalité, des pertes de mémoire, ou des hallucinations (INERIS, 2010). La dose létale pour l'Homme, par la voie orale, a été estimée à partir d'empoisonnements accidentels entre 1 et 3 mg/kg/j, soit de 70 mg à 210 mg pour une personne de 70 kg (Toxnet NLM, 2001). Le trioxyde d'arsenic est l'espèce la plus souvent mise en cause dans ces intoxications aiguës.

Aucun décès n'a été rapporté suite à une exposition à de fortes doses d'arsenic par inhalation, même dans le cas d'expositions professionnelles pouvant aller jusqu'à 100 mg/m³ (ATDSR, 2007). Dans ces cas-là, des irritations du tractus respiratoire surviennent, et se traduisent par une toux, une

dyspnée et des douleurs thoraciques. Suite à des expositions cutanées répétées à des poussières ou à des solutions aqueuses de trioxyde d'arsenic, des brûlures sévères, des dermatoses, telles que des érythèmes, de l'eczéma ou des folliculites peuvent survenir.

De nos jours, les empoisonnements aigus à l'arsenic sont très exceptionnels, cependant les expositions chroniques à ce métalloïde sont devenues un problème de santé publique majeur pour des millions d'individus à travers le monde. Ces empoisonnements touchent majoritairement les populations consommant une eau de boisson concentrée en arsenic, comme au Bangladesh, et sont à l'origine de nombreux effets cliniques chez l'Homme.

II.2 TOXICITÉ CHRONIQUE

II.2.1 Cancérogénicité

II.2.1.1 *Cancers dont l'incidence est augmentée par l'arsenic*

L'exposition chronique à l'arsenic est associée à l'augmentation de l'incidence de plusieurs cancers. En effet, l'arsenic inorganique a été l'une des premières substances à être identifiée comme cancérogène humain. Il est classé cancérogène avéré pour l'Homme par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer), l'US-EPA (United States Environmental Protection Agency) et l'Union européenne. Les effets cancérogènes de l'arsenic se développent après une période de latence comprise entre 20 et 30 ans. Le risque de cancers semble augmenter dès la consommation chronique d'eau de boisson contenant plus de 10 µg/L, qui est de ce fait la concentration limite conseillée par l'OMS. Les cancers les plus communs, induits lors d'une exposition chronique par voie orale, sont les cancers cutanés, notamment les carcinomes spinocellulaires et basocellulaires (ATDSR, 2007). Les premiers cas de cancers cutanés induits par l'arsenic ont été observés chez des patients traités avec la solution de Fowler, qui contenait 1% d'arsenite de potassium et qui avait été élaborée en 1786 pour la prise en charge de diverses affections. De nos jours, de nombreuses études épidémiologiques ont démontré cette association entre l'arsenic et les cancers cutanés chez des populations exposées chroniquement via la consommation d'eau de boisson contaminée, en particulier à Taïwan, au Chili en Argentine ou au Bangladesh (Rossman et al., 2004). Ces cancers sont souvent précédés d'atteintes cutanées caractéristiques telles que des hyperkératoses, qui traduisent une prolifération cellulaire aberrante et qui peuvent évoluer en carcinome spinocellulaire (Rossman et al., 2004).

Diverses études épidémiologiques ont démontré que l'exposition chronique à l'arsenic inorganique peut aussi augmenter l'incidence de cancers des poumons lors d'exposition par voie respiratoire. Mais, il est important de noter que ce métalloïde est aussi l'un des rares cancérogènes

chimiques induisant des cancers du poumon chez des individus exposés par voie orale (IARC, 2012). Des cancers de la vessie, et dans une moindre mesure du foie, des reins ou de la prostate ont également été associés à une exposition chronique à l'arsenic.

II.2.1.2 Mécanismes de carcinogénicité

De nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires ont été proposés pour expliquer les effets cancérigènes de l'arsenic. L'arsenic pourrait favoriser la transformation cellulaire par des processus impliquant notamment i) des effets génotoxiques indirects résultant de la production d'EAO ou d'altérations de la réparation de l'ADN, ii) des effets épigénétiques liés à une modification des activités de méthylation et d'acétylation de l'ADN, et iii) une altération des voies de signalisation contrôlant la balance prolifération/apoptose, avec la stimulation de la prolifération cellulaire et/ou la suppression de l'expression du gène suppresseur de tumeur p53 (Kitchin, 2001). Quel que soit le mécanisme impliqué, le rôle délétère du stress oxydant induit par l'arsenic semble clairement associé à ses effets cancérigènes (Yu et al., 2006).

Les propriétés génotoxiques indirectes, et principalement clastogènes, de l'arsenic ont été démontrées dans plusieurs études expérimentales. Ce métalloïde induit des échanges de chromatides soeurs et des aberrations chromosomiques *in vitro* dans plusieurs types cellulaires. (Schuhmacher-Wolz et al., 2009). Des études épidémiologiques menées sur des personnes exposées chroniquement, par voie orale ou respiratoire, montrent également une augmentation des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes périphériques (Nordenson et al., 1978, 1979). Contrairement à de nombreux carcinogènes génotoxiques directs, l'arsenic n'induit pas de mutations ponctuelles, mais principalement des dommages chromosomiques (Bhattacharjee et al., 2013).

L'arsenic module les niveaux de méthylation de l'ADN, qui est un mécanisme de régulation épigénétique de l'expression de gènes impliqués notamment dans la balance survie/apoptose (NRC, 1999). Généralement, l'hypométhylation de l'ADN est associée à l'induction de l'expression génique. Dans ce cadre, différentes études, menées *in vivo* et *in vitro*, montrent une hypométhylation globale de l'ADN suite à une exposition chronique à l'arsenic (Okoji et al., 2002). Cette hypométhylation pourrait résulter de l'utilisation préférentielle de la SAM pour les voies métaboliques de l'arsenic, au détriment des mécanismes de méthylation de l'ADN (Reichard et al., 2007; Tapio et Grosche, 2006). Cependant, des hyperméthylations de gènes suppresseurs de tumeurs, tels que p53 et p16, peuvent également être observées dans des cellules exposées *in vitro* à l'arsenic. Certaines études épidémiologiques montrent aussi des hyperméthylations de ces gènes chez des Bangladais chroniquement exposés à l'arsenic (Chanda et al., 2006).

II.2.2 Effets systémiques non tumoraux

En plus des effets carcinogènes, l'exposition chronique à l'arsenic induit un ensemble de symptômes connus sous le nom d'arsénisme.

Les lésions cutanées en sont les signes les plus précoces et les plus sensibles. D'après une étude épidémiologique menée sur une cohorte de plus de 10 000 personnes, les effets cutanés résultant d'une exposition environnementale chronique apparaissent dès la consommation d'une eau contenant de l'arsenic à des concentrations supérieures à 10 µg/L. Les premières lésions cutanées à se manifester sont les hyperkératoses de la paume des mains et des pieds, et une perturbation de la pigmentation du tronc, caractérisée par l'alternance de zones hyperpigmentées et de petites zones hypopigmentées en « gouttes de pluie » (Ahsan et al., 2006; Guo et al., 2006) (Figure 9). Les individus exposés peuvent également développer la maladie de Bowen qui se traduit par des lésions cutanées pré-cancéreuses, qui évoluent en une dizaine d'années en carcinome basocellulaire ou spinocellulaire (Yu et al., 2006). Ces deux types de lésions sont utilisés comme marqueur d'exposition à l'arsenic.

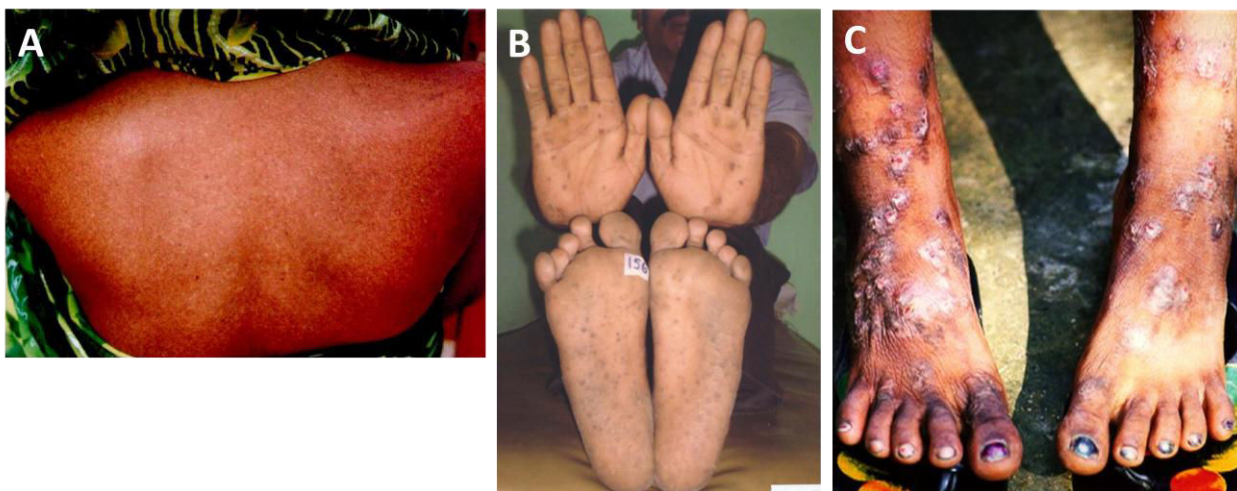


Figure 9 : Manifestations associées à une exposition chronique à l'arsenic

A : alternance des zones hyperpigmentées et hypopigmentées en « goutte de pluie » ; B : hyperkératose des mains et des pieds ; C : maladie des pieds noirs. Sources : (A, B) <http://users.physics.harvard.edu>; (C) <http://www.betterlifelabs.org>

L'exposition chronique à l'arsenic altère aussi le système cardio-vasculaire. Plusieurs études effectuées chez des salariés inhalant des vapeurs de trioxyde d'arsenic ont mis en évidence une augmentation du risque de mortalité par accident cardio-vasculaire. Les atteintes cardiaques observées comprennent notamment des arythmies cardiaques, dues à des altérations de la dépolarisation ou de la repolarisation myocardique. Il est bien démontré que l'arsenic peut modifier l'expression et l'activité de canaux potassiques favorisant le processus de repolarisation de la cellule ventriculaire. Ces altérations peuvent conduire à des mécanismes de post-dépolarisation, à un allongement de l'intervalle QT, et finalement à des torsades de pointes, dont le principal risque est

l'évolution en fibrillation ventriculaire (Zhou et al., 2007; Ficker et al., 2004). L'exposition chronique à l'arsenic peut également causer des atteintes vasculaires se traduisant par des épaississements de la couche interne de la paroi des vaisseaux sanguins, menant à une restriction du flux sanguin et à une augmentation de la pression sanguine. Ces expositions chroniques peuvent également augmenter le risque d'athérosclérose dans certaines populations (Simeonova et Luster, 2004). Le métalloïde induit aussi une nécrose des cellules endothéliales vasculaires, ce qui favorise le développement de la maladie dite des pieds noirs ou « Blackfoot disease », particulièrement répandue dans la région de Taiwan où de forts taux d'arsenic sont présents dans l'eau de boisson (170 à 800 µg/L) (Tseng, 1977). Cette maladie se caractérise par une diminution progressive de la circulation sanguine dans les mains et les pieds, se traduisant par une coloration noire des téguments pouvant évoluer en gangrène (Sengupta et al., 2008). D'autres facteurs impliqués dans l'étiologie de cette maladie pourrait expliquer la répartition de cette maladie spécifiquement dans la région de Taiwan, tels que la malnutrition, la co-exposition à d'autres substances chimiques ou encore des polymorphismes génétiques altérant les capacités de biométhylation de l'arsenic dans cette population.

L'exposition chronique à l'arsenic pourrait également être associée au diabète de type 2 chez l'adulte. En effet, plusieurs études menées dans différents pays, ont montré une augmentation de l'incidence de cette pathologie chez les personnes exposées chroniquement à l'arsenic. L'augmentation du risque pourrait survenir dès la consommation d'une eau contenant plus de 50 µg/L (Islam et al., 2012). Des atteintes du système respiratoire ont également été démontrées. Une diminution de la fonction pulmonaire évaluée par spirométrie a été constatée chez des sujets exposés approximativement à 8 à 40 µg d'arsenic par kg p.c./j et présentant des lésions au niveau de la peau. Les travailleurs, exposés fréquemment, présentent des irritations des muqueuses des voies aériennes supérieures pouvant dégénérer en bronchites chroniques. Certaines études épidémiologiques montrent une hépatotoxicité liée à l'exposition à l'arsenic par voie orale (Mazumder, 2005; Sengupta et al., 2008). L'arsenic peut en effet induire une hypertrophie du foie et favoriser le développement de fibrose, non cirrhotique, au niveau du tractus porte. Enfin, il est bien démontré que l'arsenic augmente l'incidence de neuropathies périphériques chez les individus exposés chroniquement (Vahidnia et al., 2007).

L'exposition chronique des femmes enceintes à l'arsenic est associée à des effets délétères sur le développement du fœtus. En effet, le métalloïde franchit la barrière placentaire et expose le fœtus. Cette exposition *in utero* est associée à une réduction du poids des nouveau-nés, à une augmentation du nombre d'avortements spontanés et à des troubles du développement neurocomportemental des jeunes enfants (Milton et al., 2005; Rahman et al., 2009; Hamadani et al., 2011; Parvez et al., 2011).

De plus, la mortalité infantile liée à des maladies infectieuses, de la sphère intestinale ou respiratoire, est augmentée chez ces enfants exposés *in utero*. (Rahman et al., 2010). L'arsenic possède des propriétés immunotoxiques jouant probablement un rôle majeur dans la survenue de ces pathologies infectieuses. Ce sujet fait l'objet d'un chapitre spécifique présenté paragraphe II.3.2 (p.41).

Au total, l'ensemble des effets toxiques de l'arsenic semble contribuer fortement à la mortalité globale des individus particulièrement exposés. Une étude épidémiologique récente menée sur une cohorte d'environ 11000 personnes vivant au Bangladesh a en effet démontré que plus de 20 % des décès observés dans cette population étaient attribuables à la toxicité chronique de l'arsenic (Argos et al., 2010). Cependant, malgré ses très nombreux effets délétères, l'arsenic possède des propriétés médicinales très intéressantes qui ont été exploitées de l'Antiquité à nos jours.

II.3 USAGE THÉRAPEUTIQUE DE L'ARSENIC

Les usages thérapeutiques de l'arsenic et de ses dérivés remontent à plus de 2400 ans. L'utilisation médicinale de l'arsenic est mentionnée pour la première fois par Hippocrate (460-370 av. JC) qui utilisait du réalgar et de l'orpiment, deux minéraux contenant de l'arsenic, pour traiter les ulcères. Son usage est retrouvé en Occident, suite à son introduction par Avicennes (980-1037 après JC), un médecin perse et Paracelse (1493 -1541 après JC), un médecin suisse. Au 16^{ème} et au 17^{ème} siècle, l'arsenic était notamment utilisé contre la peste et le paludisme. L'usage médicinal de l'arsenic a connu son apogée lors de l'élaboration en 1786 de la solution dite de Fowler par le médecin anglais Thomas Fowler. Ce médicament sera utilisé jusqu'au début du 20^{ème} siècle dans le cadre de traitement de la syphilis, de l'épilepsie, de l'eczéma et du psoriasis. Ces usages thérapeutiques de l'arsenic ont cependant connu un frein en Occident au 20^{ème} siècle, avec la découverte de médicaments plus efficaces et surtout moins dangereux. L'utilisation médicinale de l'arsenic a donc cessé, à l'exception du Melarsoprol, médicament contenant un composé arsénié organique. Son usage a été maintenu dans le traitement des phases tardives de la trypanosomiose, ou maladie du sommeil, car ce composé arsénié induit moins d'effets secondaires sévères que les autres traitements disponibles.

Bien que son effet positif dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes ait été entrevu dans les années 1860, l'arsenic a été oublié des cliniciens pendant presque tout le siècle dernier. Ce n'est qu'au cours des années 90, que son efficacité dans le traitement des leucémies aiguës promyélocyaires (APL) de type M3 (LAM3) a été réellement bien démontrée.

II.3.1 La leucémie aigue promyélocytaire

II.3.1.1 Physiopathologie de l'APL

La LAM3 touche la lignée granulocytaire et représente environ 10 à 15% des cas de leucémie aigüe myéloïde chez l'adulte. Cette pathologie est caractérisée par une prolifération excessive des progéniteurs myéloïde dans la moelle osseuse, et par une inhibition de leur maturation. Chez les patients atteints d'APL, la différenciation des précurseurs myéloïdes est stoppée au stade des promyélocytes. Ce blocage du processus de différenciation est causée, dans près de 95% des cas, par la translocation chromosomique t(15, 17) (Figure 10). Cette translocation entraîne une fusion des gènes PML (Promyélocytic Leukemia) et RAR α (Retinoic Acid Receptor) et génère la protéine oncogénique PML-RAR α . Cette protéine est un acteur clé dans l'induction de la LAM3, car elle interfère avec les fonctions normales des protéines RAR α et PML qui sont impliquées respectivement dans la maturation granulocytaire et la suppression de la croissance cellulaire.

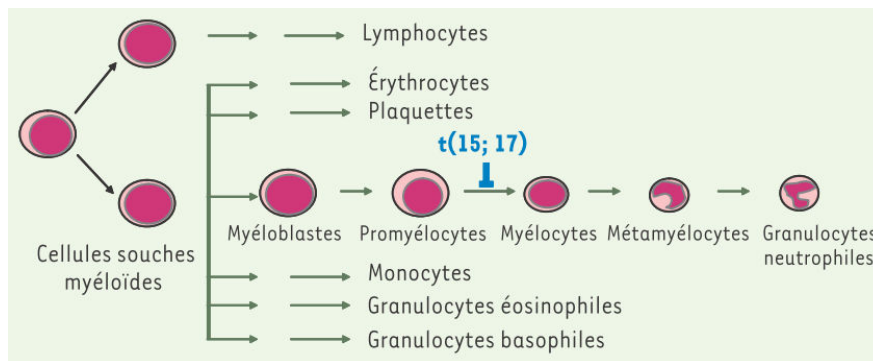


Figure 10 : Blocage de la différenciation au stade promyélocyte suite à la translocation chromosomique t(15 ;17). Source : Bobé 2008 (Medecine/Sciences)

II.3.1.2 Efficacité de du trioxyde d'arsenic dans le traitement de l'APL

Un des traitements classiquement utilisé dans le traitement de l'APL est l'ATRA (Acide Tout Trans Rétinoïque), un dérivé de la vitamine A, qui est capable de lier spécifiquement la protéine PML-RAR α et d'entraver son activité oncogénique dans les cellules leucémiques (Fang et al., 2002). L'induction de la dégradation de la protéine PML-RAR α permet une restauration de la maturation granulocytaire. Cependant, l'utilisation de l'ATRA est limitée par de nombreux cas de résistance chez les patients souffrant d'APL.

Les premières études, menées principalement en Chine, ont démontré que de faibles doses de trioxyde d'arsenic (10 mg/j) administré par voie intraveineuse sont particulièrement efficaces chez les patients rechutant et devenus résistants aux traitements anticancéreux conventionnels utilisant l'ATRA (Chen et al., 1997; Niu et al., 1999; Shen et al., 1997). L'intérêt de l'arsenic inorganique a

aussi été mis en évidence chez les patients souffrant d'APL nouvellement diagnostiquée (Lengfelder et al., 2012).

L'administration de trioxyde d'arsenic induit une rémission complète d'environ 85 % des patients, après un traitement cyclique sur près de 60 jours (Niu et al., 1999). Malgré les effets délétères de l'arsenic sur des populations exposées de manière chronique à l'arsenic, l'utilisation du trioxyde d'arsenic dans le traitement de l'APL n'est pas associée à une forte toxicité. En effet, les patients ne présentent pas d'immunosuppression, et aucun développement de tumeurs associées au trioxyde d'arsenic n'a encore été rapporté lors de suivis à long terme. Des effets secondaires peuvent néanmoins survenir, notamment des effets dermatologiques (démangeaisons, érythème, rougeurs...), gastro-intestinaux (nausée, vomissement...), des hyperleucotoses, une altération légère des fonctions hépatiques (augmentation transitoire des enzymes hépatiques dans le sérum), ainsi que des dysfonctionnements cardiaques parfois graves. Plusieurs patients sont en effet décédés de mort subite résultant très probablement de torsades de pointe ayant dégénérées en fibrillation ventriculaire (Barbey et al., 2003). L'agence américaine FDA (Food and Drug Administration) a approuvé le Trisenox, médicament à base de trioxyde d'arsenic, pour le traitement des LAM3 en septembre 2000. En France, son utilisation a été validée par l'ancienne AFSSAPS le 5 mars 2002.

Après l'injection d'une dose de 10 mg (soit en moyenne 0,15 mg/kg/jour), les taux plasmatiques d'arsenic atteignent très rapidement 5 à 7 μM , puis retombent approximativement à 1 et 0,2 μM au bout de 12 h et 24 h respectivement (Figure 11) (Shen et al., 1997). L'administration intraveineuse d'arsenic n'entraîne donc pas de bioaccumulation de ce métalloïde dans le sang.

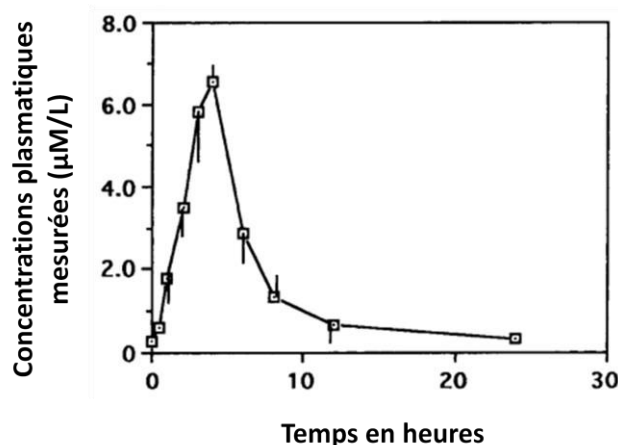


Figure 11 : Evolution de la concentration plasmatique en arsenic d'un patient atteint d'APL traité au Trisenox
Source Shen et al., 1997 (Blood)

L'efficacité thérapeutique de l'arsenic résulte de sa faculté à cibler préférentiellement les cellules APL, sans altérer la viabilité des cellules saines. Cette spécificité d'action semble liée au statut redox très bas des cellules APL, qui les rend particulièrement vulnérables aux effets pro-oxydants de l'arsenic. Les activités enzymatiques de la GPx et de la catalase sont notamment beaucoup moins élevées dans ces cellules que celles mesurées dans d'autres types de cellules non transformées ou leucémiques (Bhalla et al., 2010; Jing et al., 1999). L'efficacité de l'arsenic dans le traitement de l'APL résulte essentiellement de deux mécanismes pro-oxydants distincts: l'induction de la différenciation des cellules leucémiques lorsqu'elles sont exposées à de faibles doses de métalloïde et l'apoptose des cellules APL exposées à de plus fortes concentrations (Lengfelder et al., 2012).

Des études *in vitro* menées sur les cellules NB4, une lignée promyélocytaire exprimant la protéine de fusion PML-RAR α , et sur des cultures primaires de cellules provenant de patients souffrant d'APL, démontrent que l'arsenic stimule la différenciation des cellules APL en induisant la dégradation de la protéine de fusion PML-RAR α (Chen et al., 2011). L'arsenic oxyde, directement ou indirectement via la formation d'EAO, les fonctions thiols de résidus cystéines au sein de la protéine PML. Ces oxydations favorisent l'oligodimérisation de la protéine de fusion, puis la sumoylation et l'ubiquitination des complexes protéiques PML-RAR α , et *in fine* leur dégradation par le protéasome. Ces changements de conformation sont généralement observés lorsque les cellules APL sont exposées à des concentrations d'arsenic non cytotoxiques comprises entre 0,1 μ M et 0,5 μ M. La dégradation de la protéine PML-RAR α est ensuite associée à une reprise très rapide des processus de différenciation des précurseurs myéloïdes (Chen et al., 2011).

A des concentrations supérieures à 1 μ M, le métalloïde induit en revanche un stress intracellulaire majeur favorisant l'apoptose des cellules APL. A cette concentration, l'arsenic génère des concentrations importantes d'EAO qui altèrent le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi$ M) des cellules APL (Cai et al., 2000; Jing et al., 1999). La réduction du $\Delta\Psi$ M stimule le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme puis secondairement l'activation des caspases contrôlant le processus apoptotique des cellules APL (Miller et al., 2002). Alors que ce processus de mort cellulaire se déroule sur 48 à 72 h, il semble que le traitement des cellules NB4 avec 0,75 μ M de trioxyde d'arsenic durant 8 à 9 jours soit responsable d'une instabilité génétique et d'anomalies chromosomiques favorisant la mort des cellules. A cette concentration, l'arsenic réduit l'activité de la télomérase en inhibant l'expression de la reverse transcriptase hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) par un mécanisme, là encore, pro-oxydant. La répression de l'expression de

hTERT résulterait de l'inhibition de l'activité du facteur de transcription Sp1 oxydé par des EAO (Chou et al., 2001).

En dehors du traitement de l'APL, le potentiel thérapeutique anticancéreux de l'arsenic est actuellement étudié pour la prise en charge du myélome multiple, de syndromes myélodysplasiques et de certaines tumeurs solides comme le cancer du sein (Kritharis et al., 2013).

II.3.2 Perspectives pour l'usage thérapeutique de l'arsenic

Plusieurs études expérimentales menées *in vivo* chez la souris, et réalisées récemment en France, démontrent que l'arsenic prévient le développement de certaines maladies inflammatoires chroniques.

L'administration intrapéritonéale de trioxyde d'arsenic prévient efficacement le développement de la maladie chronique du greffon contre l'hôte (GVHD : Chronic graft-versus-host disease) dans un modèle de souris transplantées. Cette pathologie complexe serait initiée par des incompatibilités mineures entre les cellules immunitaires du receveur et celles du donneur. Les lymphocytes T (LTs) CD4⁺ du donneur, activés par des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) du receveur, semblent jouer un rôle essentiel dans les réactions inflammatoires qui se développent en particulier au niveau cutané, intestinal et vasculaire. L'arsenic inorganique pourrait prévenir les symptômes les plus sévères de cette maladie en tuant spécifiquement ces cellules immunitaires par un mécanisme de mort impliquant les EAO (Kavian et al., 2012a).

Des effets bénéfiques de l'arsenic sont également observés dans un modèle murin de sclérodermie systémique, une maladie auto-immune caractérisée par des lésions vasculaires et le développement de fibrose au niveau de différents organes. L'administration intrapéritonéale de trioxyde d'arsenic limite les dépôts majeurs de collagène au niveau cutané et pulmonaire, prévient les dommages vasculaires, réduit la production d'autoanticorps et bloque la production de cytokines de type Th2 par les LTs activés. Les effets « thérapeutiques » du métalloïde résulteraient notamment de sa capacité à tuer spécifiquement les fibroblastes proliférant au sein de ces organes par un mécanisme pro-oxydant (Kavian et al., 2012b).

Dans un modèle murin d'inflammation intestinale mimant la maladie de Crohn, l'arsenic prévient et traite les lésions inflammatoires du côlon induites chez la souris par l'acide 2,4,6 trinitrobenzènesulfonique (TNBS). L'administration intrapéritonéale de trioxyde d'arsenic bloque l'infiltration tissulaire des neutrophiles et inhibe la production massive de cytokines pro-inflammatoires produites par les LTs et les cellules dendritiques (DCs) activées (Singer et al., 2011).

Enfin, le trioxyde d'arsenic limite le développement du Lupus Erythémateux Disséminé (LED) chez la souris MLR/*lpr*. Un traitement de 1 à 2 mois avec ce métalloïde, administré en

intrapéritonéal, réprime la production d'autoanticorps, réduit les syndromes lymphoprolifératifs, inhibe la surproduction de cytokines pro-inflammatoires par les LTs activés, prévient les lésions cutanées, pulmonaires et rénales et finalement accroît la survie de ces souris. L'arsenic semble agir assez spécifiquement sur la population de LTs activés double négative en induisant leur apoptose. Le traitement de cette maladie par le trioxyde d'arsenic est actuellement testé chez l'Homme dans une étude clinique de phase 2 (Lupsenic) menée à Nantes depuis le mois de janvier 2013.

Les résultats de ces différentes études expérimentales démontrent le rôle prépondérant du stress oxydant dans les effets « thérapeutiques » du trioxyde d'arsenic. Cependant, ils suggèrent que des propriétés immunotoxiques directes du métalloïde puissent également contribuer à limiter le développement de ces pathologies inflammatoires chroniques.

II.4 EFFETS TOXIQUES DE L'ARSENIC VIS-A-VIS DES CELLULES IMMUNITAIRES HUMAINES

Le système immunitaire protège notre organisme contre les agents biologiques, tels que les virus, les bactéries ou les parasites, et limite la prolifération de certaines cellules cancéreuses. Son fonctionnement repose sur différents acteurs : organes, tissus, cellules et molécules. Ces éléments permettent, en discriminant le soi du non-soi, une identification des menaces auxquelles l'organisme est confronté et la mise en place rapide de mécanismes de défense contre les antigènes du non-soi. Ces mécanismes incluent la réponse immunitaire innée, immédiate et non spécifique, et la réponse immunitaire adaptative, plus tardive, mais spécifique de l'antigène considéré. La réponse innée implique un grand nombre d'acteurs cellulaires incluant notamment des phagocytes (macrophages, neutrophiles), les granulocytes (mastocytes, éosinophiles, basophiles) et les cellules NK (Natural Killers) alors que la réponse adaptative est principalement contrôlée par les DCs et les LTs. L'immunité adaptative met en jeu la capture et la maturation par les DCs d'antigènes spécifiquement exprimés par les agents pathogènes ou les cellules tumorales. La présentation des peptides antigéniques permet l'activation des LTs CD4⁺ au sein des structures ganglionnaires. L'interaction des cellules présentatrices d'antigènes avec les LTs stimule *in fine* l'activité cytotoxique des LTs CD8⁺ puis la lyse des agents pathogènes ou des cellules tumorales exprimant l'antigène spécifique.

Différentes études épidémiologiques récentes démontrent que l'arsenic augmente l'incidence d'infections opportunistes, telles que celles de la tuberculose, ou d'infections fongiques, chez les individus fortement exposés par le biais d'une consommation d'eau de boisson contaminée (Smith et al., 2011). L'exposition chronique au métalloïde accroît également le risque de bronchectasie, une maladie pulmonaire caractérisée par des lésions inflammatoires irréversibles des bronches, qui sont à l'origine d'insuffisance respiratoire (Smith et al., 2006; Mazumder, 2005). La prévalence de la bronchectasie est notamment dix fois plus élevée chez des individus présentant des lésions cutanées,

résultant d'une exposition à l'arsenic, par-rapport à des individus sans lésions. Le développement de cette pathologie est très fortement associé à la répétition des infections pulmonaires durant la petite enfance. D'une façon générale, le développement d'infections de la sphère respiratoire ou digestive est l'une des causes importantes de décès chez les individus exposés chroniquement (Argos et al., 2010; Chen et al., 2009). L'augmentation de la prévalence des infections microbiennes, virales ou parasitaires dans les populations exposées résulte en grande partie des effets délétères de l'arsenic sur le système immunitaire. Dans ce cadre, plusieurs études d'épidémiologie moléculaire, menées aux USA, au Mexique et au Bangladesh, montrent que l'exposition chronique à l'arsenic est associée à une altération de l'expression de gènes contrôlant la réponse immunitaire dans les cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) (Salgado-Bustamante et al., 2010; Andrew et al., 2008; Argos et al., 2006). Ces études transcriptomiques mettent notamment en évidence une diminution de l'expression des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II, de gènes codant des protéines de défense immunitaires ou des cytokines inflammatoires. En particulier, ces travaux montrent une corrélation entre les taux urinaires d'arsenic et la répression de l'expression du gène codant le TNF- α (Tumor Necrosis Factor). Récemment, deux études épidémiologiques ont également associé, chez l'enfant, l'augmentation de l'incidence d'infections des voies respiratoires et des diarrhées avec l'exposition *in utero* à l'arsenic (Rahman et al., 2010; Raqib et al., 2009). Dans ces études, les taux urinaires maternels d'arsenic sont inversement corrélés à l'index thymique du jeune enfant et aux taux de facteurs de croissance dans le lait, tels que l'IL-7 (IL : Interleukine) et la lactoferrine. Plus largement, un grand nombre d'études expérimentales menées *in vivo* et *in vitro*, mais également quelques études cliniques, démontrent que ce métalloïde est véritablement immunotoxique et principalement immunosuppresseur vis-à-vis de l'activité des LTs et des macrophages.

II.4.1 Arsenic et LTs

Plusieurs études cliniques démontrent une corrélation, chez l'enfant ou l'adulte, entre l'exposition à l'arsenic, les taux urinaires du métalloïde et l'activité *ex-vivo* des LTs stimulés (Biswas et al., 2008; Soto-Peña et al., 2006; Gonshebbatt et al., 1994; Ostrosky-Wegman et al., 1991). La prolifération polyclonale des LTs stimulés *ex-vivo* par des lectines, ainsi que la sécrétion d'IL-2 par ces LTs activés, sont inversement corrélés à l'excrétion urinaire de l'arsenic chez ces individus. La sécrétion d'autres cytokines produites par le LT activé, telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10, l'IFN- γ (IFN : Interféron) et le TNF- α , est également diminuée (Biswas et al., 2008). L'arsenic semble altérer plus spécifiquement la physiologie des LTs CD4⁺ car le nombre de ces LTs circulants et le rapport CD4/CD8 sont diminués chez les individus exposés, alors que la proportion de LTs CD8⁺ n'est pas

modifiée (Soto-Peña et al., 2006). Ces effets immunosuppresseurs de l'arsenic sont retrouvés chez la souris exposée *in vivo*, notamment concernant la répression de la prolifération des LTs et de la sécrétion de l'IL-2 (Soto-Peña et Vega, 2008; Conde et al., 2007; Burns et al., 1993). Les mécanismes moléculaires à l'origine des effets immunosuppresseurs de l'arsenic, lors d'exposition *in vivo*, sont encore très mal connus. Une étude montre toutefois que l'administration intrapéritonéale de doses élevées d'arsénite de sodium induit, chez la souris, une atrophie thymique associée à la répression de gènes de type E2F impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Nohara et al., 2008). Une autre étude, menée *in vivo* et *ex-vivo*, suggère que l'arsenic peut impacter la physiologie des LTs en modifiant certaines voies de signalisation résultant de l'activation du récepteur des LTs (TCR : T Cell Receptor) (Soto-Peña et Vega, 2008). En particulier, le métalloïde pourrait augmenter de façon excessive les niveaux de phosphorylation des Src kinases Lck et Fyn, qui sont très rapidement induites lors de l'activation du TCR dans les splénocytes de souris. La perturbation de ces événements moléculaires, cruciaux dans l'induction du phénotype des LTs activés, pourrait contribuer aux effets de l'arsenic sur l'expression de l'IL-2 qui dépend notamment de l'activation de la kinase Fyn (Palacios et Weiss, 2004). Enfin, le métalloïde réprime les réactions d'hypersensibilité retardée, qui sont contrôlées par les LTs, chez la souris (Patterson et al., 2004), le rat (Schulz et al., 2002) et le poulet (Aggarwal et al., 2008).

Les effets immunosuppresseurs de l'arsenic vis à vis des LTs ont également été démontrés avec des cellules humaines exposées et stimulées *in vitro* (Tenorio et Saavedra, 2005; Galicia et al., 2003). Dans ces conditions expérimentales, l'arsenic réduit la prolifération des LTs humains et réprime l'expression de l'IL-2. En revanche, le métalloïde n'altère ni l'expression du récepteur à l'IL-2 (CD25a) ni celle du CD69, un marqueur précoce de l'activation lymphocytaire, mais il retarde la progression du cycle cellulaire des LTs. Cependant, dans ces études, les LTs sont stimulés avec des lectines qui ne miment pas la co-stimulation physiologique de ces cellules. Les effets directs de l'arsenic sur la différenciation et la polarisation des LTs humains ou de souris ne sont pas connus.

II.4.2 Arsenic et macrophages

Tout comme les DCs, le macrophage a la capacité de présenter l'antigène aux LTs. Mais c'est avant tout un acteur cellulaire jouant un rôle majeur dans les défenses immunitaires innées. Le macrophage participe en effet à l'élimination d'agents pathogènes, après phagocytose, en produisant des EAO et des espèces activées de l'azote. Il a été récemment démontré que l'activité de phagocytose et la formation d'EAO étaient significativement diminuées dans des macrophages différenciés *in vitro* à partir de monocytes sanguins périphériques issus d'individus chroniquement exposés à l'arsenic et présentant des lésions cutanées (Banerjee et al., 2009). De façon similaire, le

traitement de souris avec de l'arsénite de sodium réduit i) la production d'EAOs et d'espèces activées de l'azote, ii) l'adhérence, iii) l'activité de phagocytose, iv) la présentation d'antigène et v) la migration des macrophages spléniques isolés (Sengupta et Bishayi, 2002; Sikorski et al., 1991). Chez cette espèce, l'arsenic semble réprimer la physiologie *ex-vivo* des macrophages spléniques en stimulant leur apoptose (Sengupta et Bishayi, 2002); la fragmentation d'ADN est en effet trois fois plus importante dans ces macrophages chez les souris exposées à de faibles doses de métalloïde par rapport aux animaux témoins. L'arsenic diminue également significativement la production d'espèces activées de l'azote dans les macrophages de poulet (Aggarwal et al., 2008) et dans les hémocytes de mollusque (Chakraborty et al., 2009).

Chez l'homme, les monocytes recrutés sur les sites inflammatoires peuvent se différencier en macrophages sous l'action de facteur de croissance comme le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor). Il est possible de reproduire ce type de macrophage *in vitro* en cultivant pendant 6 à 7 jours des monocytes, isolés du sang périphérique, en présence de GM-CSF. Notre équipe a montré que la différenciation des monocytes en macrophages est bloquée lorsque ces cellules sont cultivées en présence d'arsenic inorganique. Le métalloïde induit l'apoptose des monocytes en inhibant l'activation de la voie NF- κ B par le GM-CSF (Lemarie et al., 2006a); dans ce modèle expérimental, NF- κ B contrôle différentes voies de survie indispensables à la différenciation des macrophages. De plus, l'arsenic inorganique diminue l'adhérence, l'activité de phagocytose et d'endocytose lorsque des macrophages sont exposés au métalloïde après le processus de différenciation (Lemarie et al., 2006b; Sakurai et al., 2006). Ces effets résultent en partie de modifications de l'organisation du réseau d'actine au sein du cytosquelette et semblent contrôlés notamment par l'activation de la voie de signalisation RhoA-ROCK dans le macrophage exposé au métalloïde. En parallèle, l'arsenic reverse en partie le phénotype et le génotype des macrophages matures. Enfin, l'exposition prolongée des macrophages à l'arsenic inorganique augmente l'activité de la NADPH oxydase et la production d'EAOs sans altérer la viabilité cellulaire (Lemarie et al., 2008).

II.4.3 Arsenic et cellules dendritiques

Contrairement aux études menées sur les LTs et les macrophages, très peu de données sont disponibles, sur les effets de l'arsenic vis à vis des cellules dendritiques (DCs). Pourtant ces cellules jouent un rôle clé dans l'induction et l'orientation de la réponse immunitaire adaptative. Des travaux menés *in vivo* chez la souris montrent que l'exposition chronique à l'arsenic, via la consommation d'eau contaminée, diminue le recrutement des DCs dans les ganglions lymphatiques lors d'une infection par le virus H1N1 (Kozul et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc que l'arsenic pourrait

moduler les propriétés de migration des DCs, au moins chez la souris. Cependant, les résultats obtenus sur deux modèles murins d'hypersensibilité retardée sont contradictoires. En effet, une première étude suggère que l'arsenic diminue la migration des DCs vers les tissus ganglionnaires (Patterson et al., 2004), alors que la seconde montre au contraire une augmentation de l'infiltration ganglionnaire par les DCs lorsque les souris sont exposées au métalloïde (Lee et al., 2012). Toutefois, les individus, exposés par voie environnementale et présentant des lésions cutanées, ont des réactions d'hypersensibilité de contact diminuées et un nombre de DCs au niveau de la peau également atténué (Qu et al., 1997). L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'arsenic peut certainement impacter la physiologie des DCs humaines.

III. LES CELLULES DENDRITIQUES

III.1 CLASSIFICATION DES DCs

Les DCs ont été isolées pour la première fois dans l'épiderme, par Paul Langerhans en 1868, qui les nomment alors « cellules de Langerhans ». Ce n'est qu'une centaine d'années plus tard que des cellules présentant une morphologie similaire aux cellules isolées par Paul Langerhans seront identifiées par Steinman et Cohn. Ces cellules sont nommées « cellules dendritiques » du fait de leur morphologie présentant des dendrites (Steinman et Cohn, 1973). Les DCs sont des cellules présentatrice d'antigène dites « professionnelles », en raison de leur aptitude à capter l'antigène et à le présenter aux LTs. Cet événement va initier et orienter une réponse immunitaire spécifique à l'antigène, ce qui fait des DCs un acteur majeur entre immunité innée et acquise (Banchereau et Steinman, 1998; Steinman et Nussenzweig, 2002). Les DCs sont présentes dans la plupart des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. Elles se situent principalement aux points d'entrée des agents pathogènes, comme l'épiderme, les muqueuses, les poumons ou les intestins, où elles jouent le rôle de sentinelles. Les DCs constituent un type cellulaire très hétérogène comportant actuellement quatre sous-ensembles ayant une localisation et des fonctions souvent assez spécifiques : les DCs conventionnelles, les cellules de Langerhans, les DCs plasmacytoïdes et les DCs dérivées des monocytes (Belz et Nutt, 2012).

Les DCs conventionnelles regroupent des cellules différenciées à partir de progéniteurs classiques de cette lignée, tels que les CDP (Common DC Progenitor) et les pré-DCs. Les DCs conventionnelles sont subdivisées en deux sous-types comprenant les DCs migratoires et les DCs des tissus lymphoïdes. Comme leur dénomination l'indique, les DCs migratoires ont la capacité de migrer du tissu périphérique vers certains organes lymphoïdes. Ces cellules ne sont cependant pas retrouvées dans la rate mais uniquement dans les ganglions lymphatiques. Les DCs migratoires se divisent globalement en DCs CD11b⁻ et en DCs CD11b⁺ qui sont principalement identifiées dans le tissu cutané et intestinal (Belz et Nutt, 2012). Les DCs des tissus lymphoïdes sont retrouvées dans la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques. Ces DCs peuvent être caractérisées selon l'expression membranaire des marqueurs CD4 et CD8 qu'elles présentent. Ces DCs ne circulent pas et se différencient à partir de précurseurs présents dans les tissus lymphoïdes où ces cellules résident.

Les cellules de Langerhans résident dans la peau et migrent dans les tissus lymphoïdes pour présenter les antigènes aux LTs. Contrairement aux DCs conventionnelles, ces cellules ne dérivent pas d'un précurseur myéloïdes mais d'une cellule précurseur myélomonocytaire LY6C⁺ présente localement au sein du tissu cutané (Belz et Nutt, 2012). Les DCs plasmacytoïdes sont des cellules circulantes produisant de grandes quantités d'IFN- α et jouant certainement un rôle important dans les

infections virales. Cependant ces cellules ne sont pas dotées d'activité de présentation de l'antigène et leur contribution exacte dans la réponse immune reste mal comprise (Kushwah et Hu, 2011). Les monocytes sont des leucocytes circulants effecteurs de l'immunité innée et précurseurs de types cellulaires clé comme les macrophages ou les DCs. Sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance, les monocytes recrutés sur un site inflammatoire peuvent se différencier en iDCs. Ces cellules ont un phénotype distinct de celui des DCs conventionnelles et sont fréquemment dénommées DCs inflammatoires. En effet, dans un contexte inflammatoire, la différenciation des DCs à partir des monocytes permet d'amplifier rapidement une population de cellules présentatrices fonctionnelles aisément mobilisables.

Les concentrations de DCs circulants dans le sang périphérique sont faibles et leur accessibilité dans les tissus humains est très limitée. De ce fait, plusieurs modèles *in vitro* de différenciation de DCs ont été développés dans le but de faciliter l'étude de ce type cellulaire. Les modèles de différenciation *in vitro* de DCs sont fondés sur l'utilisation de deux précurseurs : les cellules souches CD34⁺ issues de la moelle osseuse ou de sang de cordon ombilical, et les monocytes présents dans la circulation sanguine périphérique (Ardavin et al., 2001). Après leur isolement, les cellules souches humaines CD34⁺ peuvent se différencier en iDCs pendant 7 jours de culture en présence de GM-CSF, de TNF- α recombinant et de Flt3-ligand.

Les DCs dérivées des monocytes, qui ont été étudiées au cours de ce travail de thèse, font l'objet d'une présentation plus détaillée dans les paragraphes suivants.

III.2 LES DCs HUMAINES DERIVEES DES MONOCYTES

III.2.1 Différenciation *in vitro* des DCs à partir des monocytes

Les monocytes CD14⁺ sont des cellules myéloïdes capables de se différencier *in vitro* en DCs en présence de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et d'IL-4 en 5 à 7 jours (Sallusto et Lanzavecchia, 1994). L'IL-4 peut être remplacée par de l'IL-13 (Alters et al., 1999). Le phénotype des DCs obtenues se rapproche des DCs inflammatoires générées *in vivo* à partir des monocytes recrutés sur le site inflammatoire. Le GM-CSF, dont les niveaux augmentent lors de l'inflammation, semble jouer un rôle privilégié dans la différenciation et la survie de ces DCs (Laar et al., 2012). *In vivo* chez l'animal, des injections quotidiennes de GM-CSF ont notamment pour effet d'augmenter la quantité de DCs inflammatoires dans la rate et le thymus des souris traitées (O'Keeffe et al., 2002; Daro et al., 2000). Le GM-CSF est également un facteur impliqué dans la différenciation des monocytes en macrophage. Dans ce contexte, l'ajout de l'IL-4, permet d'inhiber cette différenciation macrophagique et d'orienter la différenciation des monocytes vers les DCs (Ardavin et al., 2001). En fin de culture, ces DCs dérivées de monocytes sont majoritairement non

adhérentes et ont perdu l'expression membranaire du marqueur monocyttaire CD14. Elles présentent également une morphologie et un phénotype de DC immatures, dotées de nombreuses dendrites, d'une forte capacité de phagocytose mais sécrétant de très faibles quantités d'IL-12p70 et d'IL-23. Il est intéressant de noter que des DCs dont le phénotype est proche de celui des cellules de Langerhans peuvent également être obtenues *in vitro* à partir de monocytes cultivés en présence de GM-CSF et d'IL-15 (Mohamadzadeh et al., 2001).

III.2.2 Phénotype des DCs immatures

Les iDCs dérivées de monocytes sont caractérisées par l'expression membranaire d'au moins deux marqueurs spécifiques, le DC-SIGN et le CD1a.

Le DC-SIGN (Dendritic Cell Specific Intercellular adhesion molecule-3 Grabbing Non-integrin) est un récepteur aux lectines de type C, dont la fonction principale est la reconnaissance des glycannes contenant du mannose ou du fucose. Il permet notamment une endocytose spécifique et rapide, lors de la reconnaissance de son ligand. Il facilite également les interactions physiques directes des DCs avec les LTs (Garcia-Vallejo et van Kooyk, 2013). Le DC-SIGN est exprimé par les iDCs dans les tissus périphériques et par les DCs matures (mDCs) dans les organes lymphoïdes. Son expression est notamment régulée par l'IL-4 (Relloso et al., 2002).

Le CD1a est une glycoprotéine appartenant à la famille des CD1. Cette famille de protéine contribue, comme les molécules du CMH de classe 1 et 2, à la présentation de l'antigène aux LTs. Elle est spécialisée dans la présentation des antigènes lipidiques, glycolipidiques et lipopeptidiques (De Libero et Mori, 2005). Les molécules de la famille des CD1, dont le CD1a, sont fortement exprimées sur les iDCs dérivées de monocytes. En effet, alors que l'expression membranaire des molécules du CMH dépend de la maturation des DCs, l'expression du CD1a est beaucoup plus élevée dans les iDCs que dans les mDCs. Cette particularité rend les iDCs capable de présenter aux LTs les antigènes spécifiquement associés au CD1a, ce qui d'un point de vue physiologique permet, en court-circuitant le processus de maturation, de déclencher une réponse des LTs spécifique plus rapide (Cao et al., 2002).

Les iDCs expriment faiblement les molécules de CMH de classe 2. Les molécules de costimulation ne sont pas (CD80), ou légèrement (CD86), exprimées dans les iDCs (McAdam et al., 1998). Enfin, les iDCs ont une capacité de présentation des peptides antigéniques aux LTs très modeste (Banchereau et Steinman, 1998).

III.2.3 Phénotype des DCs matures

Pour initier le processus de maturation, les iDCs sont activées *in vivo* par la stimulation de nombreux récepteurs qu'elles expriment à leur surface. L'activation de ces récepteurs est essentielle et peut être mimée *in vitro* par l'ajout de ligands des Toll-like receptors (TLRs), tels que le LPS (Lipopolysaccharide), dans le milieu de culture des DCs. L'utilisation de différents cocktails de cytokines inflammatoires permet également l'activation *in vitro* des iDCs.

Lorsque la DC est activée, un changement du profil migratoire de la DC s'opère. Au niveau des récepteurs à chimiokines, la maturation se traduit par l'acquisition du récepteur de surface CCR7 (C-C Chemokine Receptor 7). Ce récepteur reconnaît les chimiokines CCL19 (C-C Chemokine Ligand 19) et CCL21 (C-C Chemokine Ligand 21), exprimées par les vaisseaux lymphatiques et les organes lymphoïdes secondaires. L'expression de CCR7 permet à la DC de quitter les tissus et de gagner les ganglions drainant la zone inflammatoire (Schumann et al., 2010).

Pendant sa migration, la DCs continue d'être soumise au processus de maturation jusqu'au ganglion lymphatique où elle stimule les LTs naïfs. Les mDCs sont caractérisées, en plus de l'expression de CCR7, par une expression membranaire importante des molécules de CMH de classe 2 comme HLA-DR, des molécules de costimulation CD80 et CD86, et de CD83.

Le CD83 est une glycoprotéine de 45 kDa, appartenant à la superfamille des immunoglobulines, classiquement décrit comme un marqueur spécifique des mDCs (Zhou et Tedder, 1995). En effet, les monocytes et macrophages expriment le CD83, mais de façon transitoire, contrairement aux DCs qui l'expriment de manière stable (Cao et al., 2005). Les fonctions de ce marqueur ne sont pas très bien connues. Cependant, l'extinction de CD83 dans les DCs, avec des SiRNAs, réduit leur capacité de stimulation des LTs, suggérant donc un rôle essentiel du CD83 dans ce processus d'activation (Prechtel et al., 2007).

Les molécules de costimulation CD80 (ou B7-1) et CD86 (B7-2) sont exprimées de manière abondante à la surface des mDCs. Ces ligands interagissent avec la molécule CD28, exprimée constitutivement par les LTs, mais avec des affinités différentes. En effet, l'affinité de CD80 pour CD28 est supérieure à celle de CD86. En association avec la présentation de l'antigène couplée au CMH, la liaison des molécules de costimulation à leur récepteur est responsable d'une sécrétion optimale d'IL-2 et d'une forte expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) dans les LTs. L'expression de CD40 par les DCs fournit un autre signal de costimulation via son interaction avec CD40L exprimé par les LTs (Santin et al., 1999). La maturation des DCs s'accompagne aussi de changements phénotypiques conduisant à une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence qui participent au fonctionnement de la synapse immunologique.

III.3 FONCTIONS BIOLOGIQUES DE LA CELLULE DENDRITIQUE

III.3.1 Capture et présentation de l'antigène par les DCs (Figure 12)

La DC peut capturer l'antigène, soluble ou lié à des récepteurs, par macropinocytose, phagocytose et endocytose.

La capture par phagocytose permet l'internalisation des particules, de micro-organismes ou de cellules mortes par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques de la famille des Fc (FcγRI ou CD64, FcγRII ou CD32, FcγRII ou CD16) ou de récepteurs du complément, par un processus dépendant des mouvements du cytosquelette d'actine. Dans ce mode de capture, les antigènes se lient aux récepteurs et sont internalisés par des vésicules recouvertes de clathrine.

Les antigènes peuvent également être capturés par endocytose. Les récepteurs permettant aux DCs de capturer les antigènes par endocytose sont les récepteurs Fc, les lectines de type C comme DEC-205 (CD205), le récepteur au mannose (CD206), les récepteurs « scavenger » ainsi que le DC-SIGN (CD209) (Banchereau et Steinman, 1998). La capacité de capture des antigènes des DCs est très efficace. En effet, des concentrations d'antigène de l'ordre du pM ou du nM suffisent généralement pour qu'une DC présente l'antigène, alors que le macrophage nécessite des concentrations de l'ordre du μM (Satthaporn et Eremin, 2001).

Au cours du processus de maturation, la DC apprête également l'antigène afin de le présenter aux LTs, qui ne reconnaissent pas l'antigène natif, c'est-à-dire non associé à une molécule du CMH. L'apprêtement de l'antigène consiste à le fragmenter en petits peptides, puis à les associer avec les molécules du CMH. Les antigènes d'origine exogène, comme les antigènes viraux, sont dégradés par le protéasome puis associés aux molécules du CMH de classe 1 pour être présentés aux LTs (Norbury et al., 1997). Les molécules du CMH de classe 2, comme les molécules HLA-DR ou HLA-DM chez l'Homme, sont mobilisées pour la présentation des peptides antigéniques aux LTs CD4⁺. L'expression membranaire des molécules du CMH de classe 2 est restreinte aux cellules présentatrices d'antigène, alors celle du CMH de classe 1 est généralement ubiquitaire. Par un phénomène de présentation croisée, les DCs sont également capables de présenter les antigènes exogènes avec les molécules de CMH de classe 1 afin d'activer les LTs CD8⁺ (Heath et al., 2004).

La présentation de l'antigène aux LTs CD4⁺ se déroule au sein d'une zone de contact très organisée, appelée synapse immunologique (Figure 13). La formation de cette synapse débute par des interactions non spécifiques entre les molécules LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) et ICAM 2/3 (Intercellular Adhesion Molecule 2/3) exprimées à la surface du LT, et les molécules ICAM-1 (ou CD54) et DC-SIGN (ou CD209), exprimée par la mDC. L'engagement de plusieurs TCRs initie un premier signal conduisant à des modifications du cytosquelette, à la redistribution des

autres TCRs et à la relocalisation des molécules de costimulation CD80 et CD86 à proximité du TCR (Bromley et al., 2001).

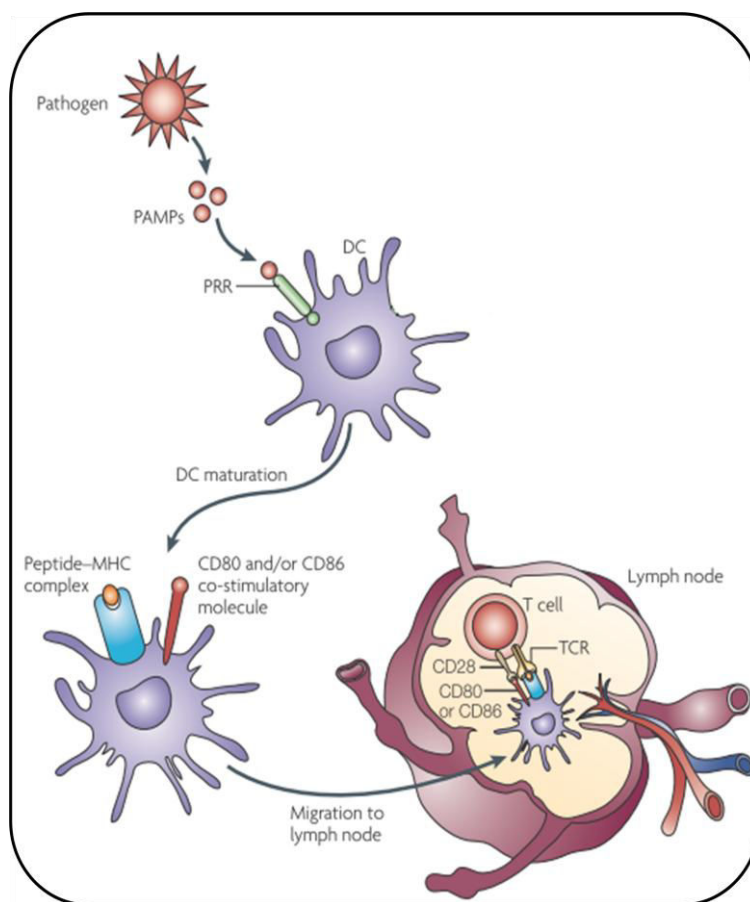


Figure 12 : Capture et présentation de l'antigène aux LTs par la DC (Kono et Rock, 2008)

L'interaction des molécules de costimulation avec le CD28, exprimé constitutivement par les LTs, constitue un deuxième signal renforçant l'activation du LT.

L'engagement de CD28 stimule l'expression de différents gènes dans le LTs activé, notamment celle des gènes codant l'IL-2 et la protéine anti-apoptotique Bcl-XL (Fraser et al., 1991).

D'autres molécules de co-stimulation participent au dialogue entre la DC et le LT. Ainsi l'interaction entre le CD40 et le CD40L (ou CD154), exprimé par les LTs, favorise la genèse de signaux co-activateurs. En effet, en plus d'accentuer l'état d'activation des LTs, cette interaction CD40/CD40L augmente l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 et celle de l'IL-12 dans les DCs. Ces événements ont donc pour effet d'augmenter les capacités activatrices de la DC (Quezada et al., 2004). Les interactions avec les molécules de co-stimulation peuvent aussi être inhibitrices. Ainsi CD80 et CD86 peuvent également interagir avec CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4), membre de la famille CD28, dont l'expression est induite lors de l'activation des LTs. Son affinité pour CD80 et CD86 est 10 à 20 fois supérieure que celle du CD28 (Greenwald et al., 2005). Son interaction avec les molécules de costimulation constitue un système de rétrocontrôle négatif

permettant l'arrêt de l'activation des LTs. La protéine CTLA-4 joue un rôle majeur dans l'induction de l'anergie et participe au maintien de la tolérance périphérique (Kurtz et al., 2009).

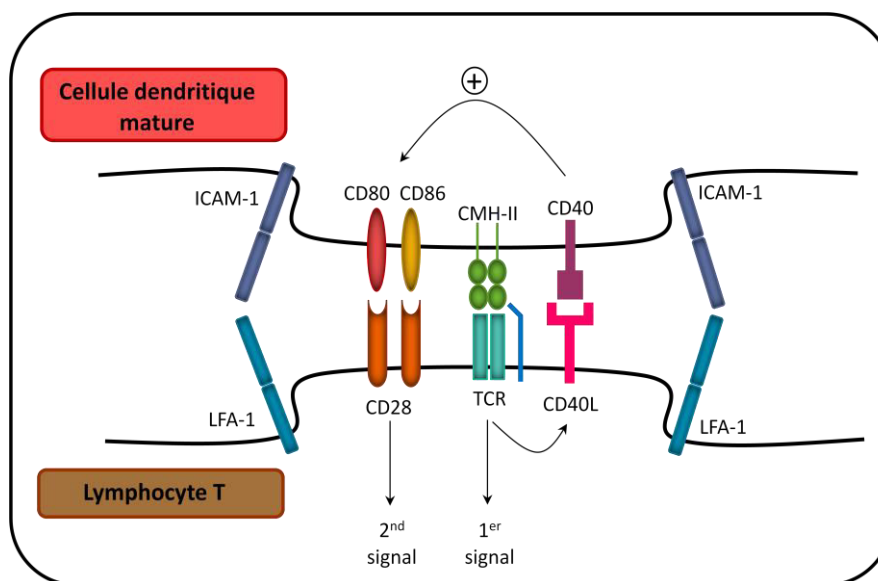


Figure 13 : Principaux acteurs moléculaires de la synapse immunologique

En plus des signaux adressés via des interactions membranaires, un troisième type de signal est également transmis par la DC sous la forme de facteurs solubles. En effet, les mDCs sécrètent des quantités importantes de cytokines, qui sont des médiateurs importants pour l'orientation de la réponse immunitaire.

III.3.2 Orientation de la réponse immunitaire

En 1986, Robert Coffman et Timothy Mossmann décrivent pour la première fois la division des LTs $CD4^+$ en différentes sous-populations fonctionnelles qu'ils nomment Th1 et Th2 en fonction de leur profil cytokinique (Mosmann et al., 1986). Depuis, d'autres sous-populations ont été mises en évidence. L'orientation vers un sous-type de LT est complexe, et est régulée à plusieurs niveaux. En effet, une multitude de signaux membranaires et solubles est intégrée par le LT $CD4^+$ naïf lors de la présentation de l'antigène. L'ensemble de ces signaux conduit à la différenciation du LT $CD4^+$ en un sous-type qui permettra la réponse la plus adaptée à l'antigène reconnu (Figure 14).

La réponse de type Th1 est une réponse dirigée contre les pathogènes intracellulaires comme les bactéries, les virus, les parasites intracellulaires, mais aussi contre les cellules cancéreuses. Elle aboutit à la différenciation des LTs $CD8^+$ cytotoxiques (CTL) qui ont une action cytotoxique spécifique vis à vis des cellules infectées ou cancéreuses. Elle est principalement induite par la sécrétion importante d'IL-12 par les DCs lors de la présentation de l'antigène aux LTs. L'IL-12 permet la différenciation des LTs $CD4^+$ naïf en LTs Th1, en induisant notamment l'expression du facteur de transcription T-bet (T-box transcription factor TBX21) (Oestreich et Weinmann, 2012).

Les LTs Th1 sont caractérisés par une sécrétion importante d'IFN- γ , caractéristique du sous-type Th1. L'IFN- γ amplifie notamment le phénotype Th1, en stimulant l'expression du facteur T-bet, et permet d'intensifier l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12, créant ainsi une boucle d'amplification positive (Zhu et al., 2012). L'IFN- γ stimule également l'activité des macrophages et des CTLs.

La réponse Th2 est de type humorale dirigée contre les pathogènes extracellulaires, comme les helminthes. Elle passe par la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre ces agents. Les principaux médiateurs de cette réponse sont les lymphocytes B (LBs) activés, ou plasmocytes, qui sécrètent de grandes quantités de d'anticorps. Les réponses Th2 sont caractérisées par l'expression de cytokines telles l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 ou l'IL-13. Ces cytokines stimulent les LBs, affectent la commutation de classe des antigènes des IgG vers les IgE et permettent le recrutement de cellules effectrices comme les éosinophiles, ou les basophiles/mastocytes qui interviennent dans la destruction de l'intrus (Kadowaki, 2007). La différenciation du LT CD4⁺ naïf en Th2 dépend de la liaison de l'IL-4 à son récepteur. Celle-ci active en effet un facteur de transcription clé dans la différenciation du sous-type Th2, la protéine GATA3. Les DCs ne sécrétant pas d'IL-4, elles ne sont pas directement impliquées dans la différenciation Th2. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer ce processus de polarisation. Elles impliquent notamment l'intervention d'autres types cellulaires tels que des cellules stromales ou épithéliales qui pourraient fournir l'environnement cytokinique propice au développement d'une réponse de type Th2 (Pulendran et al., 2010).

La réponse de type Th17 est une réponse de type inflammatoire importante dans l'immunité contre des pathogènes extracellulaires, tels que certaines bactéries ou champignons. Elle concerne en particulier les pathogènes non pris en charge par les réponses Th1 et Th2 et qui nécessitent une forte inflammation des tissus pour être détruits (Bettelli et al., 2008). Les LTs Th17 se caractérisent par la sécrétion de cytokines relayant leurs effets biologiques ; il s'agit notamment de l'IL-17, de l'IL-21 et de l'IL-22 (Zhu et al., 2010). A l'opposé des sous-types Th1 et Th2, dont la différenciation nécessite une stimulation par leurs cytokines effectrices, la différenciation du sous-type Th17 n'est pas induite par l'IL-17. En effet, la première phase de la différenciation est initiée par l'IL-1 β , l'IL-6 et le TGF- β (Tumor Growth Factor), qui induisent l'expression du facteur de transcription ROR- γ t (RAR-related orphan receptor- γ t). Ce facteur de transcription joue un rôle majeur dans la différenciation des Th17, et permet notamment l'expression de l'IL-17 et de l'IL-21. L'IL-21, en plus de permettre l'amplification de ce sous-type, induit également l'expression de la chaîne IL-12R β 1 du récepteur à l'IL-23. L'IL-21 et l'IL-23 contribuent de manière essentielle à la survie des cellules Th17 et au maintien de leur phénotype différencié (Bettelli et al., 2008).

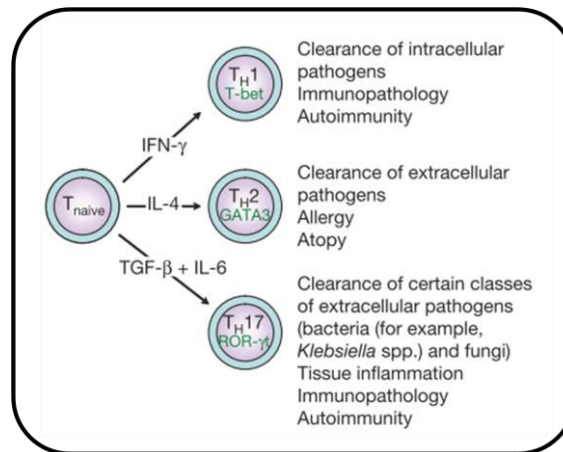


Figure 14 : Différents sous-types de lymphocytes et cytokines impliquées dans leur différenciation

L'organisme a également mis en place des mécanismes de tolérance immunitaire afin d'éviter le déclenchement de réponse immunes aberrantes. En effet, des dérèglements de la tolérance immunitaire sont souvent impliqués dans le développement de pathologies auto-immunes, ainsi que dans certains cancers. L'orientation de la réponse immunitaire s'élaborant principalement au moment de la présentation de l'antigène, la DC joue donc un rôle majeur dans la survenue de ces pathologies.

III.4 ROLE PHYSIOPATHOLOGIQUE DES DCs

III.4.1 DC et cancers

Les DCs sont des cellules très importantes dans la réponse anti-tumorale. En tant que cellules présentatrice d'antigène professionnelles, elles ont en effet les moyens de présenter aux LTs des antigènes issus de tumeurs, et donc d'induire potentiellement une réponse immunitaire anti-tumorale. Or les DCs isolées de plusieurs tumeurs présentent une altération de leur phénotype et une moindre capacité à stimuler *in vitro* les LTs (Almand et al., 2000). Plusieurs études montrent que ces DCs expriment toujours certains marqueurs caractéristiques des monocytes, ce qui suggère une perturbation de la différenciation de précurseurs myéloïdes recrutés au sein de la tumeur (Motz et Coukos, 2013). De plus, la plupart des DCs myéloïdes retrouvées dans les tumeurs présentent un phénotype de mDCs partiel. Ce phénotype est notamment caractérisé par l'expression de quantités intermédiaires de CMH de classe 1 et 2 et de molécules costimulatrices, favorisant l'anergie des LTs. De même, ces DCs produisent des quantités importantes de cytokines immunosuppressives telle que l'IL-10 (Motz et Coukos, 2013). Ces médiateurs participent notamment à l'expansion des LTs régulateurs, un sous-type de LTs impliqué dans la tolérance immunitaire périphérique et jouant probablement un rôle très important dans le développement de différents cancers. Cette perturbation de la différenciation et de la maturation des DCs pourrait constituer un mécanisme de détournement de la réponse immunitaire en faveur de la tolérance immunitaire (Motz et Coukos, 2013). La

production de DCs tolérogènes semble être un problème essentiel pour la réponse anti-tumorale de l'organisme. Cette question scientifique suscite actuellement des recherches très intenses afin de générer des vaccins *ex vivo* à l'aide de DCs non tolérogènes.

III.4.2 DCs et autoimmunité

La tolérance immunitaire périphérique aux antigènes du soi est régulée par les DCs. Or l'auto-immunité survient dans des environnements où la tolérance immunitaire à l'encontre des antigènes du soi n'est plus contrôlée. En effet, l'orientation de la réponse immunitaire vers l'immunité adaptative et la production conséquente de cytokines inflammatoires jouent un rôle dans l'étiologie de nombreuses maladies auto-immunes. Par exemple, des niveaux très élevés d'IL-17 sont observés chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, de sclérose multiple, de maladie de Crohn ou de psoriasis (Miossec et Kolls, 2012). Inversement, des études expérimentales démontrent que des souris déficientes en IL-17 présentent moins de symptômes délétères que les souris sauvages dans différents modèles murins de maladies auto-immunes (Komiyama et al., 2006; Nakae et al., 2003). Ces observations soulignent l'importance des cellules Th17, et donc des DCs qui contrôlent la différenciation lymphocytaire, dans la physiopathologie de ces maladies inflammatoires chroniques. Dans ce contexte, les DCs isolées de patients atteints de sclérose multiple sécrètent des quantités plus importantes d'IL-23 que celles isolées des personnes saines (Vaknin-Dembinsky et al., 2006). Du fait de leur implication dans la polarisation de la réponse immunitaire, les cytokines jouent donc un rôle majeur dans la physiopathologie de l'auto-immunité

III.5 CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DE QUELQUES CYTOKINES SECRETEES PAR LES DCs

Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaire dont l'action peut être paracrine, exocrine ou autocrine. On distingue les cytokines dites pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , ou le TNF- α , par opposition aux cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 et le TGF- β , qui limitent ce phénomène (Dinarello, 2000).

III.5.1 Interleukine 12 (IL-12)

L'IL-12 est une glycoprotéine hétérodimérique de 70 kDa, constituée d'une sous-unité de 35 kDa (p35) et d'une sous-unité de 40 kDa (p40). Lorsque les deux sous-unités sont coexprimées dans la même cellule, elles s'associent par des ponts disulfures pour former la forme biologiquement active, l'IL-12p70 (Gately et al., 1991). L'expression des sous-unités p35 et p40 est codée respectivement par les gènes IL12A et IL12B. L'expression du gène IL12B est restreinte aux cellules

produisant de l'IL-12p70, c'est-à-dire aux monocytes, aux macrophages et aux DCs (Trinchieri, 2003). La sous-unité p40 est produite à des niveaux 10 à 1000 fois plus importants que ceux de p35 et peut être sécrétée sous forme d'homodimère. Dans les DCs et les macrophages, la sécrétion d'IL-12p70 est donc limitée par la quantité de sous-unité p35 exprimée. L'IL-12p70 induit ses effets biologiques en se fixant sur son récepteur, IL-12R, présent surtout sur les LTs activés, les NKs, mais aussi sur les DCs. Ce récepteur est composé de 2 chaînes, l'IL-12R β 1 et l'IL-12R β 2, qui permettent l'activation de la voie des JAK (Janus Kinase)-STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Les effets de l'IL-12p70 sont principalement relayés par STAT4 et sont de nature pro-inflammatoire. En effet, en plus d'induire la différenciation des LTs en cellules Th1, l'IL-12p70 stimule des acteurs de l'immunité cellulaire. Elle stimule notamment l'activité bactéricide des macrophages en induisant l'expression d'IFN- γ par les cellules NK. Elle renforce l'activité cytotoxique de ces cellules, ainsi que celle des CTLs, en induisant l'expression de molécules cytotoxiques telles que la perforine ou la granzyme (Trinchieri, 2003). Du fait de ses propriétés pro-inflammatoires, cette cytokine est également impliquée dans le développement de différentes pathologies inflammatoires, notamment celle de maladies auto-immunes.

III.5.2 Interleukine 23 (IL-23)

L'IL-23 est une cytokine hétérodimérique composée de la sous-unité p40, commune avec l'IL-12, et d'une sous-unité de 19 kDa (p19), qui présente 40% d'homologie avec la sous-unité p35. Les deux sous-unités p40 et p19 sont associées par des ponts disulfures et sont codées respectivement par les gènes *IL12B* et *IL-23A*. La sous-unité p19 est exprimée dans les macrophages, les DCs, les LTs et les cellules endothéliales. Comme pour l'IL-12p70, la sous-unité p40 étant essentiellement exprimée par les cellules présentatrices d'antigène, seuls les macrophages et les DCs activés secrètent de l'IL-23.

Les effets de l'IL-23 résultent de l'activation de son récepteur qui est composé de la chaîne IL-12R β 1, commune avec le récepteur de l'IL-12, et de la chaîne IL-23R (Oppmann et al., 2000). Le récepteur à l'IL-23 est exprimé sur les LTs activés, les LTs mémoires ou les cellules NK et à de plus faibles niveaux sur les monocytes, macrophages et les DCs. Le récepteur, qui est couplé avec la voie JAK-STAT, induit principalement la phosphorylation de STAT3 et, dans de plus faibles proportions, celle de STAT4 (Kastelein et al., 2007). L'IL-23 est, à l'instar de l'IL-12, sécrétée par les DCs de manière précoce en réponse à une stimulation antigénique. En plus de son rôle de maintien du phénotype des LTs Th17, elle amplifie l'inflammation en stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1, l'IL-17. Du fait de ce potentiel pro-inflammatoire et de son

rôle dans la stimulation des LTs Th17, l'IL-23 est impliquée dans la physiopathologie des différentes maladies auto-immunes.

III.5.3 Interleukine 8 (IL-8)

L'IL-8, ou CXCL8 est une chimiokine principalement impliquée dans l'attraction des neutrophiles lors des processus inflammatoires. Elle a également la capacité d'induire la prolifération des cellules endothéliales et la formation de capillaires. L'IL-8 est produite par des types cellulaires divers tels que les monocytes et les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes, et différents types de cellules épithéliales. Cette chimiokine induit ses effets biologiques via son récepteur, exprimé sur des cellules telles que les neutrophiles, les LTs, les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les basophiles. Son expression peut être induite par différents ligands des TLRs (LPS), par des cytokines inflammatoires (l'IL-6 ou le TNF- α), mais également par de nombreuses molécules chimiques et notamment par l'arsenic inorganique. En effet, les facteurs de stress chimiques ou cellulaires, tels que l'hypoxie ou l'acidose, régulent positivement le gène codant l'IL-8 (Shi et al., 2001). Enfin, une expression constitutive d'IL-8 est retrouvée dans de nombreux types de tumeurs ; généralement, l'IL-8 produite stimule la prolifération de ces cellules cancéreuses (Xie, 2001).

III.5.4 Interleukine 10 (IL-10)

L'IL-10 est un homodimère de 35 kDa dont les deux sous-unités sont associées de manière non covalente (Sabat et al., 2010). L'expression de l'IL-10 est une caractéristique de la plupart des leucocytes. Cette cytokine est reconnue par son récepteur, IL-10R, composé de deux chaînes, IL-10R1 et IL-10R2. La liaison de l'IL-10 à son récepteur active des membres de la famille des JAK-STAT, la signalisation de l'IL-10 étant principalement relayée par STAT3. Les effets biologiques de l'IL-10 sont variés et présentent plusieurs facettes, mais sont majoritairement immunosuppresseurs. L'IL-10 inhibe en effet la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-8 ou le TNF- α (Sabat et al., 2010). De plus, cette cytokine réduit également la capacité de présentation de l'antigène, l'expression membranaire des molécules du CMH de classe 2 et celle des molécules de costimulation. Cette cytokine intervient également lors de l'orientation de la réponse immunitaire. En inhibant la synthèse d'IL-12 et de l'IL-23 par les cellules présentatrices d'antigène, l'IL-10 réprime la différenciation des LTs Th1 et Th17, et favorise l'émergence des LTs régulateurs (Ouyang et al., 2011).

III.5.5 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire exerçant ses effets sous forme membranaire et soluble. Cette cytokine est notamment sécrétée par les macrophages, les cellules NK, les LTs et LBs, mais également par les DCs activés. Les effets du TNF- α sont variés, cependant son rôle majeur consiste à assurer la défense anti-infectieuse de l'organisme. Cette cytokine module en effet des processus inflammatoires très rapides tels que la vasodilatation, la perméabilité, le chimiotactisme, et elle favorise les mécanismes de destruction tissulaires. De plus, le TNF- α active la production de nombreuses autres cytokines inflammatoires et celle de facteurs de croissance comme le GM-CSF. Le TNF- α est enfin très impliqué dans le développement de plusieurs maladies auto-immunes et en particulier celui de la polyarthrite rhumatoïde (Brennan et al., 1998).

III.6 LES TLRs

III.6.1 Description de la famille des TLRs

La détection des agents pathogènes permet l'activation des DCs et la mise en place de l'immunité adaptative. Les agents pathogènes sont détectés via des récepteurs particuliers, les Pathogen Recognition Receptor (PRRs), qui reconnaissent des structures ou motifs moléculaires communs aux micro-organismes, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern). Les PRRs peuvent également reconnaître des molécules endogènes libérées des cellules endommagées, les DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern), ce qui permet notamment l'émergence de l'inflammation suite à des chocs stériles. La détection des PAMPs ou des DAMPs par les PRRs active la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Ces gènes codent principalement pour des cytokines pro-inflammatoires, des IFNs, des chimiokines ou des protéines antimicrobiennes. Les PRRs comptent 4 familles de récepteurs aux PAMPs, dont font partie les TLRs. Cette famille de récepteurs compte 10 membres différents reconnaissant des motifs moléculaires distincts, qui permettent l'émergence d'une réponse adéquate à des catégories différentes de micro-organismes (Tableau 2).

Le TLR 2 interagit avec des molécules issues de bactéries, de mycoplasmes, de champignons et de virus ; il interagit également avec le zymosan, un composé de la membrane de levure. Le TLR2 reconnaît son ligand en formant un hétérodimère avec le TLR1 ou le TLR6.

TLRs	Localisation	Ligand	Origine du ligand
TLR1	Membrane plasmique	Lipoprotéine triacylés	Bactérie
TLR2	Membrane plasmique	Lipoprotéine	Bactérie, virus, parasite, antigènes du soi
TLR3	Endolysosome	ARN double brin	Virus
TLR4	Membrane plasmique	LPS	Bactérie, virus, antigènes du soi
TLR5	Membrane plasmique	Flagellin	Bactérie
TLR6	Membrane plasmique	Lipoprotéine diacylés	Bactérie, virus
TLR7/8	Endolysosome	ARN simple brin	Bactérie, virus, antigènes du soi
TLR9	Endolysosome	ADN (motif CpG)	bactérie, virus, protozoaire, antigène du soi
TLR10	Endolysosome	Non connu	Non connu
TLR11	Membrane plasmique	Molécule de type "Profiline"	Protozoaire

Tableau 2: Les TLRs et leurs ligands existant chez l'Homme
D'après Takeuchi et Akira, 2010

Cette association en hétérodimère permet une reconnaissance plus spécifique des ligands. Le TLR1/2 et le TLR 2/6 reconnaissent en effet des lipoprotéines triacylées et diacylées respectivement. L'activation du TLR2 induit la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages et les DCs, mais elle ne modifie pas celle des IFN de type 1 (Takeuchi et Akira, 2010).

Le TLR4 interagit avec le LPS, un composant de la membrane externe des bactéries Gram-. Le LPS est dans un premier temps reconnu à la surface des cellules par le corécepteur au LPS, le CD14, ancré dans la membrane cellulaire par un domaine GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (Wright et al., 1990). Le CD14 n'ayant pas de domaine intracellulaire, le complexe CD14/LPS s'associe avec le TLR4 couplé à la protéine accessoire MD2 (Myeloid Differentiation Factor) afin de permettre la transduction du signal (Guha et Mackman, 2001). Le TLR4 reconnaît en plus du LPS des protéines constitutives de l'enveloppe virale de certains virus (Takeuchi et Akira, 2010).

Les TLRs 7/8 chez l'Homme, équivalent du TLR7 chez la souris, reconnaît les ARNs simple brins provenant de virus à ARN ou de certaines bactéries (Mancuso et al., 2009). Ce TLR est également activé par des composés analogues aux petites purines (Imidazoquinoline), tel que le R848. L'activation de ces TLRs stimule la production de cytokines pro-inflammatoires et celle d'IFNs de type 1.

Les localisations cellulaires des TLRs diffèrent selon le type de PAMPs reconnus. Ainsi la plupart des TLRs sont exprimés à la surface de la cellule pour reconnaître leur ligand dans le milieu extracellulaire. Cependant, les TLRs reconnaissant des acides nucléiques peuvent également être présents dans le milieu intracellulaire dans les endosomes. Cet emplacement est stratégique, car les acides nucléiques exogènes, comme ceux des virus, sont présents dans les domaines intracellulaires des cellules infectées. De plus, la présence compartimentée des TLRs dans des lysosomes présente l'avantage d'éviter des réactions auto-immunes avec l'ADN de la cellule (Barton et Kagan, 2009).

L'ensemble des TLRs est exprimé de manière importante dans les cellules présentatrice d'antigène. Cependant, la répartition des différents TLRs diffère selon les types cellulaires. En effet les DCs plasmacytoïdes exprimant par exemple une plus grande proportion de TLR 7 et 9, impliqué dans la reconnaissance des virus (Kato et al., 2005).

III.6.2 Voies de signalisation activées par les TLRs

Après reconnaissance de leur ligand, les TLRs recrutent des protéines adaptatrices via leur domaine TIR, motif commun à la famille des TLRs et situé sur le domaine cytoplasmique du récepteur. La nature des protéines adaptatrice est importante, car elle conditionne les voies de signalisation activées. Ainsi la signalisation induite en aval peuvent être scindée en deux voies majeures, selon la protéine adaptatrice impliquée : la voie dépendante de la protéine adaptatrice Myd88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), et la voie dépendante de la protéine adaptatrice TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) (Kawai et Akira, 2007).

III.6.2.1 La voie dépendante de Myd88

La protéine Myd88 est essentielle pour la transduction de nombreux TLRs, à l'exception du TLR3 qui n'est pas associé avec cette protéine adaptatrice. Les TLRs 2 et 4, dont la signalisation dépend de Myd88, nécessitent toutefois l'intervention d'autres protéines adaptatrices comme la protéine TIRAP (Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein) /Mal (Myd88 Adapter Like) qui relie l'activation du TLR à celle de Myd88. Une fois activée, la protéine Myd88 interagit par son domaine de mort DD (Death Domain) avec le domaine N-terminal de la sérine/thréonine kinase IRAK4 (IL-1R associated kinase). IRAK4 active ensuite d'autres membres de la famille IRAK, comme IRAK1 et IRAK2, protéines associées en dimères (Kawagoe et al., 2008). Suite à leur phosphorylation, les protéines IRAKs se dissocient de Myd88 pour interagir avec TRAF6 (TNFR associated factor 6). TRAF6 induit ensuite des réactions de polyubiquitination qui ont pour effet d'activer TAK1 (TGF- β activated kinase 1), une sérine-thréonine kinase appartenant à la famille des MAPKK-Kinases. L'activation de TAK1 induit la phosphorylation de la MAP-Kinase 6 et des IKKs, ce qui aboutit respectivement à l'activation de la voie des MAPKs et de la voie NF- κ B (Figure 15).

III.6.2.2 La voie dépendant de TRIF

L'analyse de souris déficientes pour Myd88 a démontré que les TLRs 3 et 4 sont capables d'induire certaines voies de signalisation indépendamment de Myd88. La protéine TRIF constitue un autre type de protéine adaptatrice des TLRs. Le TLR3 possède la particularité de n'être associé

qu'avec TRIF, alors que la signalisation en aval du TLR4 passe à la fois par Myd88 et TRIF. Le TLR4 nécessite en outre l'intervention de la protéine adaptatrice TRAM. Une fois activée, la protéine TRIF peut s'associer avec plusieurs protéines : TRAF6, commune avec la voie dépendante de Myd88, et TRAF3. Cette dernière est notamment impliquée dans l'activation de deux kinases apparentées à IKK, TBK1 (TANK Binding Kinase) et IKK ϵ , qui activent la voie NF- κ B. Par des réactions de phosphorylation, TBK1 et IKK ϵ permettent également l'activation de certains IRFs (IFN Regulatory Factor), tels qu'IRF3 et IRF7. Suite à son activation, IRF3 induit l'expression principalement d'IFN- β en se fixant sur ces éléments de réponse. Cet IFN de type 1 agit en retour sur la cellule en induisant l'expression d'IRF7 (Kawai et Akira, 2007). IRF3 est également impliqué dans la régulation de la sous-unité p35 de l'IL-12.

Ces différentes voies activées par les TLRs sont à l'origine des effets observés lors de la maturation des DCs. Ainsi les voies NF- κ B et des MAPKs permettent l'émergence des caractéristiques phénotypiques des DCs matures, tels que l'expression des molécules de costimulation ou la sécrétion de cytokines.

III.6.3 Effet synergique de l'IFN- γ avec la signalisation des TLRs

L'intégration d'un grand nombre de signaux relatifs à l'environnement par la DC, lors de l'activation de ses TLR, module l'intensité de sa stimulation. Par exemple, la stimulation du TLR en présence d'IFN- γ , un IFN de type 2, induit un effet synergique sur l'activation de la DC. En particulier, en présence d'IFN- γ , l'activation des TLR induit une expression beaucoup plus importante et optimale des sous-unités p35 et p40 de l'IL-12 dans la DC et le macrophage (Snijders et al., 1998).

L'effet synergique sur la production de cette cytokine résulte d'une augmentation très significative de l'expression du gène IL12A dans les DCs costimulées. La fixation de l'IFN- γ sur son récepteur induit l'activation de STAT1, un facteur de transcription possédant des éléments de réponse dans le promoteur du gène IL12A. La fixation de STAT1 sur ses éléments de réponse potentialise la réponse des DCs stimulées notamment par des ligands des TLR4 ou des TLR2.

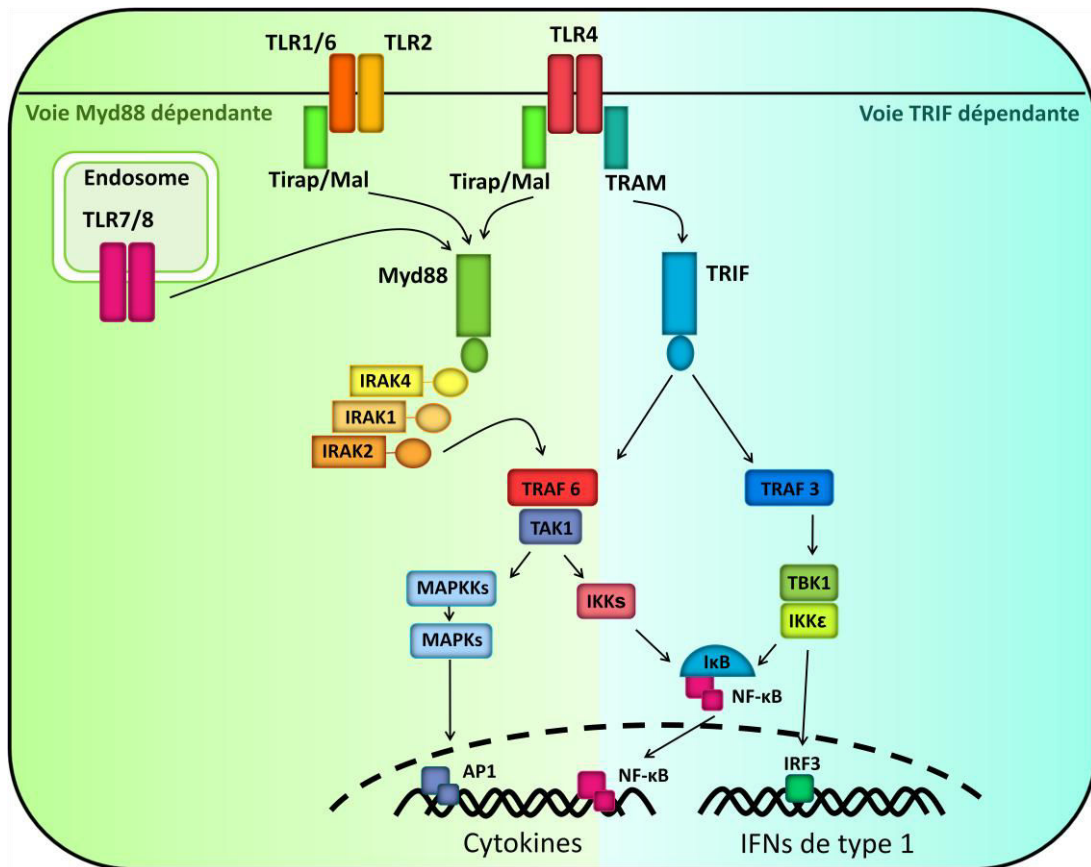


Figure 15 : Voies de signalisation MyD88 et TRIF dépendantes (D'après Kawai et Akira 2007)

L'arsenic est un contaminant environnemental majeur, classé en première position sur la liste 2011 des substances chimiques à étudier en priorité par l'agence américaine ATSDR (Agency for toxic substance and disease registry). En effet, ce métalloïde augmente l'incidence de nombreuses maladies, dont celle de cancers, chez les individus exposés chroniquement. Cependant, l'arsenic inorganique est également un médicament anticancéreux très efficace, lorsqu'il est utilisé à court terme, pour traiter certaines leucémies aiguës myéloïdes. De plus, l'efficacité et la tolérance de ce métalloïde sont actuellement étudiées dans un essai clinique de phase 2 chez des patients souffrant de lupus systémique, une maladie auto-immune grave. L'arsenic inorganique est en fait une substance immunotoxique de nature essentiellement immunosuppressive. Ces propriétés immunosuppressives pourraient favoriser un dérèglement des processus d'immunosurveillance des cancers chez les individus exposés chroniquement. Mais les effets immunosuppresseurs de l'arsenic pourraient également contribuer à prévenir, à court ou moyen terme, le développement de certaines maladies inflammatoires particulièrement graves. Des études cliniques, et des travaux expérimentaux menés *in vitro* ou chez l'animal, ont démontré que l'arsenic inorganique altère principalement les fonctions des LTs et des macrophages. En revanche, l'impact du métalloïde sur la physiologie des DCs est peu connu. Pourtant, ces cellules présentatrices d'antigène jouent un rôle fondamental dans les défenses de l'organisme, notamment contre les cancers, et sont très impliquées dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse étaient d'étudier les effets de l'arsénite de sodium, une forme inorganique trivalente, sur la différenciation et la maturation *in vitro* des DCs humaines. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les effets de concentrations d'arsenic, compatibles avec les taux plasmatiques mesurés chez les individus exposés, sur la différenciation de DCs « inflammatoires » à partir de monocytes de sang périphérique prélevés chez des sujets sains. Nous avons déterminé les effets du métalloïde sur l'expression membranaire des marqueurs caractéristiques des iDCs, sur l'activité d'endocytose, sur l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires à partir DCs matures, et sur la capacité de ces DCs matures à activer les LTs humains. Dans un second temps, nous avons recherché les mécanismes moléculaires contrôlant les effets immunotoxiques de l'arsenic inorganique sur les principales fonctions des DCs matures. Nous avons notamment identifié le rôle du facteur de transcription Nrf2.

I. PRODUITS CHIMIQUES ET RÉACTIFS

Les cytokines humaines recombinantes utilisées telles que le GM-CSF et l'IL-4 proviennent respectivement de chez Shering Plough et de chez Milteniy Biotech (Bergisch Gladbach, Allemagne). L'IFN- γ , l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 ont eux été fournis par Peprotech, Inc (Neuilly-Sur-Seine, France). L'As(III) (arsénite de sodium), le tBHQ, le LPS (*Escherichia Coli*, 055 :B5), le phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) et la ionomycine proviennent de chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Enfin, le R848 et le zymosan ont été commandés chez In Vivogen (San Diego, USA).

II. CULTURE CELLULAIRE

II.1 GÉNÉRATION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES

Les cellules dendritiques sont obtenues suite à la différenciation *in vitro* de monocytes circulants avec de l'IL-4 et du GM-CSF. Les monocytes sont triés à partir de concentrés leuco-plaquettaire de donneurs sains, fournis par l'Etablissement Français du Sang (EFS, Rennes). Le don du sang étant anonyme en France, nous n'avons aucune connaissance des caractéristiques principales des donneurs.

II.1.1 Obtention des cellules dendritiques immatures (iDCs) et matures (mDCs)

Les monocytes sont triés à partir de cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC). Les PBMCs sont obtenus par centrifugation des concentrés leuco-plaquettaires sur gradient de Ficoll (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède). Les monocytes sont ensuite isolés par sélection positive. Pour cela, les cellules à trier sont lavées dans du PBS supplémenté en sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF-DC) (0,5% (v/v)) (Invitrogen), et en EDTA (2 mM). Ce tampon est employé par la suite tout au long du tri des monocytes. Les PBMCs sont ensuite marquées avec des billes magnétiques de 50 nm de diamètre couplées à un anticorps monoclonal anti-CD14, marqueur caractéristique de la population monocyttaire. Après une incubation de 20 min à 4°C, les cellules sont passées dans une colonne composée d'une matrice de sphères ferromagnétiques (MACS Cell Separation Column (LS), Milteniy Biotech), qui lorsqu'elle est traversée par un champ magnétique

généralisé par un aimant (QuadroMACS, MiltenyBiotech), permet la rétention des cellules marquées. Ces cellules sont ensuite éluées après le retrait de la colonne du champ magnétique, par pression sur celle-ci avec un piston (Figure 16). Cette méthode de sélection permet d'obtenir des populations de monocytes CD14⁺ pures à plus de 90 %.

Après le tri, les monocytes sont ensemencés en plaque de 6 puits à une concentration de 500 000 cellules/mL, dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) enrichi avec du SVF-DC (10% (v/v)) (Invitrogen), de la pénicilline (100 IU/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL) (Invitrogen). Pour générer des iDCs, les monocytes sont mis en culture 6 jours (37 °C, 5% de CO₂) avec de l'IL-4 (50 ng/mL) et du GM-CSF (500 IU/mL), d'après le protocole décrit par Sallusto et coll. (Sallusto et Lanzavecchia, 1994). Au bout de 6 jours de différenciation les iDCs surnageantes sont lavées, comptées, et ré-ensemencées à une concentration de 500 000 cellules/mL. Les iDCs sont ensuite stimulées de 6 h à 24 h avec des ligands des TLRs, dans le but d'obtenir des mDCs. Le LPS (25 ng/mL), le zymosan (10 µg/mL) ou le R848 (3 µg/mL), qui sont respectivement des ligands des TLR-4, TLR-2 et TLR-7/8, ont été utilisés, en absence ou en présence d'IFN-γ (50 ng/mL) qui permet d'optimiser la production de cytokines par les mDCs.

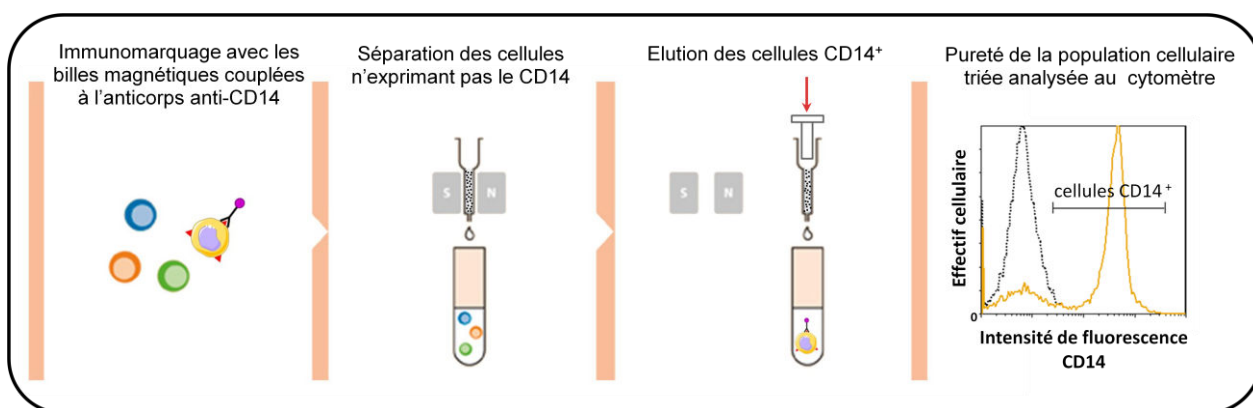


Figure 16: Principe du tri de monocytes par sélection positive
D'après www.miltenybiotech.com

II.1.2 Traitements des cellules par As(III)

Pour étudier l'impact d'une exposition à As(III) sur la différenciation des DCs, les monocytes ont été mis en contact avec des concentrations croissantes d'As(III) dès le début de la différenciation à J0 et cela pendant 6 jours. Les iDCs sont ensuite lavées et analysées, ou bien stimulées par les différents ligands des TLRs dans un milieu sans As(III) (Figure 17).

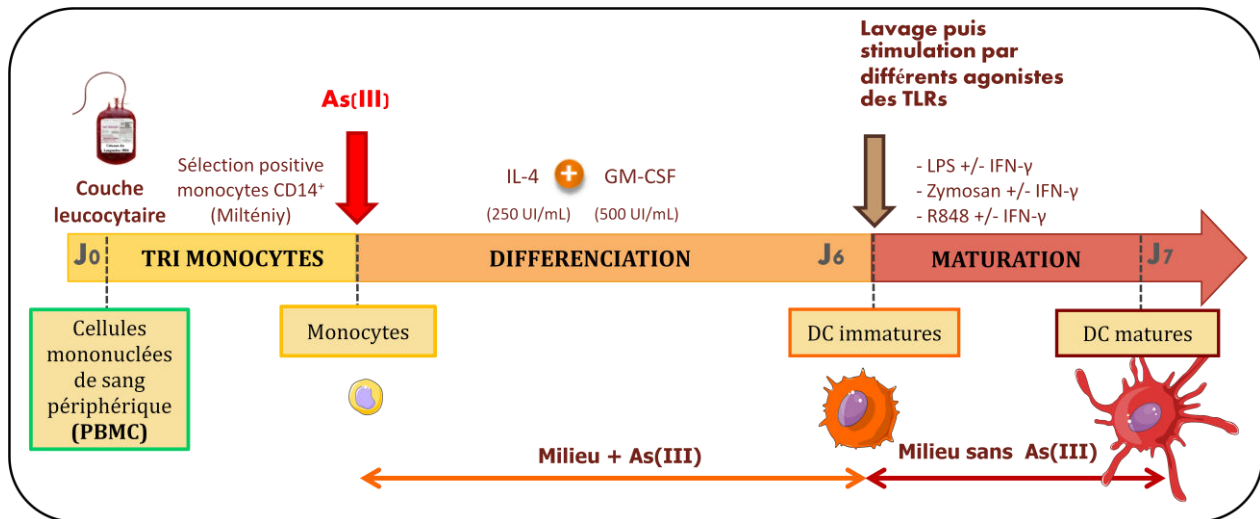


Figure 17: Modèle expérimental utilisé pour étudier les effets d'As(III) sur la différenciation des DCs

Pour étudier les effets directs d'As(III) sur la maturation des DCs, les monocytes sont différenciés en iDCs pendant 6 jours en absence d'As(III). Les iDCs, recueillies à J6, sont ensuite traitées pendant 2 h avec des concentrations croissantes d'As(III) puis stimulées avec du LPS en absence ou présence d'IFN-γ (Figure 18).

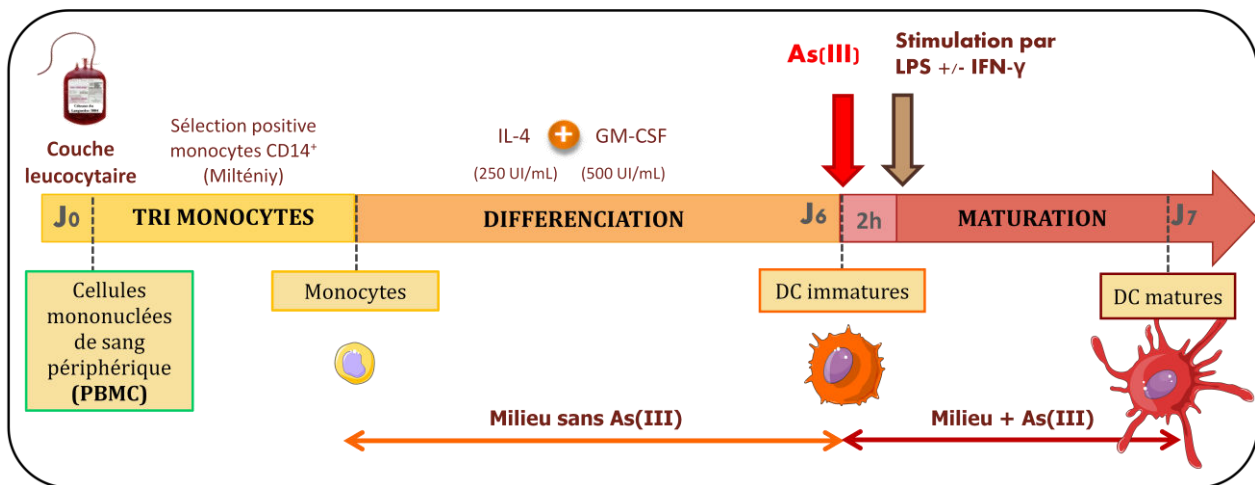


Figure 18: Modèle expérimental utilisé pour étudier les effets d'As(III) sur la maturation des DCs

II.2 ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES T HUMAINS (LTs)

Les PBMCs, obtenus par centrifugation sur gradient de Ficoll sont mis à adhérer pendant 1 h, afin de séparer les monocytes qui adhèrent au fond des boîtes de culture. Les LTs CD4⁺ sont isolés à partir des PBMCs non adhérentes par sélection négative, en utilisant le kit Dynabeads® Untouched Human CD4⁺ T cells (Invitrogen), selon les instructions du fournisseur. Les cellules à trier sont lavées dans du PBS supplémenté en EDTA (2 mM) et en SVF-DC (0.1% (v/v)), tampon qui sera

utilisé tout au long du tri des LTs CD4⁺. Un mélange d'anticorps dirigé contre toutes les cellules n'exprimant pas le marqueur CD4 est ensuite appliqué aux cellules lors d'une incubation de 20 min à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées, et mises en contact 15 min à température ambiante avec des billes magnétiques Dynabeads® (Invitrogen) qui se lient aux cellules immunomarquées. Celles-ci sont ensuite séparées des LTs CD4⁺ à l'aide d'un aimant (Figure 19). Après le tri, les LTs CD4⁺ sont ensemencés à une concentration de 1 000 000 cellules/mL dans du milieu contenant du RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté avec du SVF-DC (10 %_(v/v)) (Invitrogen), de la pénicilline (100 IU/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL) (Invitrogen).

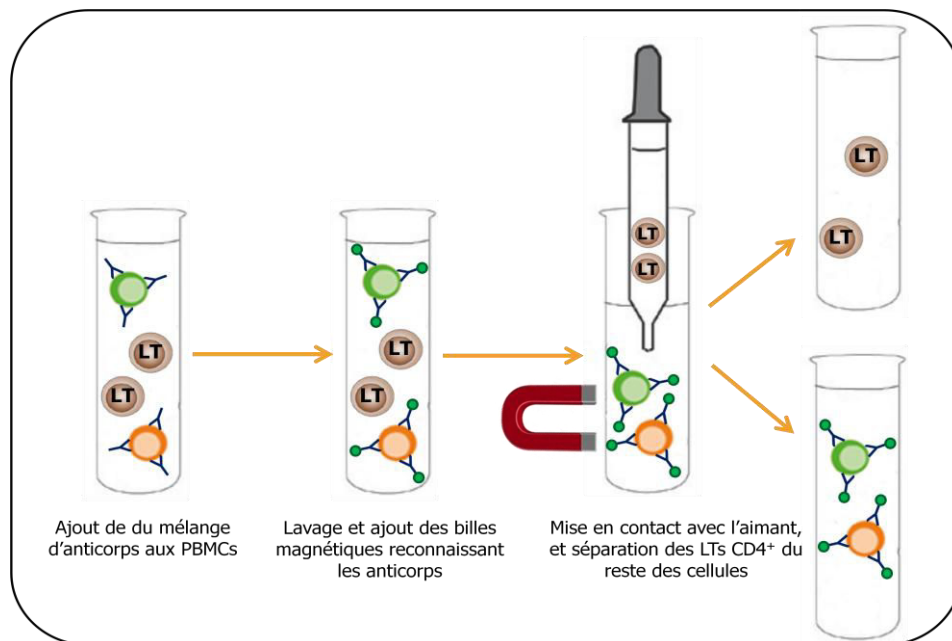


Figure 19: Principe du tri de LTs CD4⁺ par sélection négative
D'après www.products.invitrogen.com

III. DÉTERMINATION DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE

III.1 TEST D'EXCLUSION AU BLEU TRYPAN

La viabilité des cellules a été évaluée dans un premier temps par un test d'exclusion au bleu trypan, colorant ayant la propriété de colorer en bleu les cellules mortes, du fait de leur intégrité membranaire altérée. La viabilité cellulaire a été déterminée sur les iDCs et les mDCs après 24 h de maturation. 20 µL de suspension cellulaire bien homogénéisée est reprise dans 80 µL de bleu Trypan (0,4%_(v/v)) (InVitrogen), avant un comptage immédiat sur lame de Malassez.

III.2 MARQUAGE A L'IODURE DE PROPIDIUM

L'iodure de propidium est un agent intercalant des acides nucléiques. Son incapacité à pénétrer dans les cellules dont l'intégrité membranaire est préservée permet la détection des cellules en nécrose ou en phase d'apoptose tardive. La viabilité cellulaire est déterminée sur les iDCs, et les mDCs après 24 h de maturation.

Les cellules sont lavées deux fois au PBS. Après avoir été reprises dans 100 µL de PBS pour 100 000 cellules, les cellules sont mises à incuber avec d'iodure de propidium (2,5 µg/mL) 15 min à 4°C et à l'abri de la lumière. Après ajout de 400 µL de PBS, les échantillons sont immédiatement lus au cytomètre FC500 et analysés en FL-2.

IV. IMMUNOPHÉNOTYPAGE DES POPULATIONS CELLULAIRES

L'expression des marqueurs caractéristiques des monocytes, des iDCs, des mDCs et des LTs a été caractérisée par cytométrie en flux. Les anticorps utilisés pour la caractérisation de ces types cellulaires sont présentés dans le Tableau 3.

Population recherchée	Anticorps	Isotype	Fluorochrome	Fournisseur	Filtre de lecture au cytomètre FC-500
Monocyte	CD14	IgG2a	PE	Miltenyi Biotech	FL-2
Cellules dendritiques immatures	CD1a	IgG1	FITC	BD Biosciences	FL-1
	DC-SIGN, CD209	IgG1	FITC	Miltenyi Biotech	FL-1
Cellules dendritiques matures	CD80	IgG1	FITC	BD Biosciences	FL-1
	CD83	IgG1	FITC	BD Biosciences	FL-1
	CD86	IgG1	FITC	BD Biosciences	FL-1
Lymphocytes T	CD4	IgG1		BD Biosciences	FL-1
Contrôle isotypique	-	IgG1	FITC	BD Biosciences	FL-1
	-	IgG2a	PE	BD Biosciences	FL-2

Tableau 3 : Marqueurs membranaire utilisés pour l'immunophénotypage des monocytes, iDCs et mDCs
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine, PE : Phycoérythrine

Pour le marquage, les cellules sont incubées 20 min dans la glace dans une solution de RPMI contenant du SVF-DC (5% (v/v)) afin de saturer les sites de fixation et d'éviter les marquages aspécifiques. Après avoir été remises en suspension dans du PBS, les cellules sont incubées pendant 15 min avec l'anticorps spécifique ou le contrôle isotypique approprié. Après lavage, les échantillons sont analysés avec le cytomètre FC-500 (Beckman-Coulter, Hialeah, FL), à raison de 10 000 évènements par échantillon. Les graphes enregistrés sont ensuite traités par le logiciel d'acquisition et d'analyse CXP (Beckman-Coulter). L'expression spécifique des marqueurs membranaires a été

calculée en soustrayant aux valeurs brutes des moyennes d'intensité de fluorescence (MFI ou Mean Fluorescence Intensities) les valeurs de MFI obtenues avec les contrôles isotypiques.

V. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENDOCYTIQUE DES IDCs

L'endocytose, une des caractéristiques fonctionnelles des IDCs, a été mesurée par l'internalisation de billes de dextran couplée à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) par cytométrie en flux. 500 000 IDCs par condition ont été incubées avec 1 mg/mL de billes de FITC-dextran (wt 40 000) (Sigma Aldrich) pendant 60 min à 37°C. Un témoin négatif a été réalisé en parallèle en incubant des cellules avec le FITC-dextran à 4°C.

Après 2 lavages pour éliminer le FITC-dextran non internalisé, les cellules sont lues en FL-1 et analysées par cytométrie en flux. Les valeurs traduisant l'endocytose du FITC-dextran ont été exprimées en % de cellules positives, après une normalisation par-rapport au témoin négatif :

$$\% \text{ cellules marquées au FITC-dextran (37}^{\circ}\text{C)} - \% \text{ cellules marquées au FITC-dextran (4}^{\circ}\text{C)}$$

VI. CO-CULTURES DES DCs AVEC LES LTs CD4⁺

VI.1 CULTURES CELLULAIRES

La capacité des DCs à stimuler l'activité des LTs CD4⁺ allogéniques a été évaluée lors d'expériences de co-cultures. Les DCs, ont préalablement été différenciées en absence ou en présence d'As(III) à 0,25 μ M, puis stimulées avec du LPS pendant 48 h dans un milieu sans métalloïde. Différentes concentrations de mDCs ont ensuite été cultivées pendant 5 jours avec un nombre fixe de LTs CD4⁺. Des IDCs non stimulées ont été utilisées comme témoin négatif pour ces expériences de co-cultures. L'impact des mDCs sur la physiologie *in vitro* des LTs a été étudiée, d'une part, en analysant la prolifération des LTs et, d'autre part, en quantifiant la sécrétion de cytokines à partir de LTs restimulés avec du PMA (20 ng/mL) et de la ionomycine (1 μ M) pendant 24 h (Figure 20).

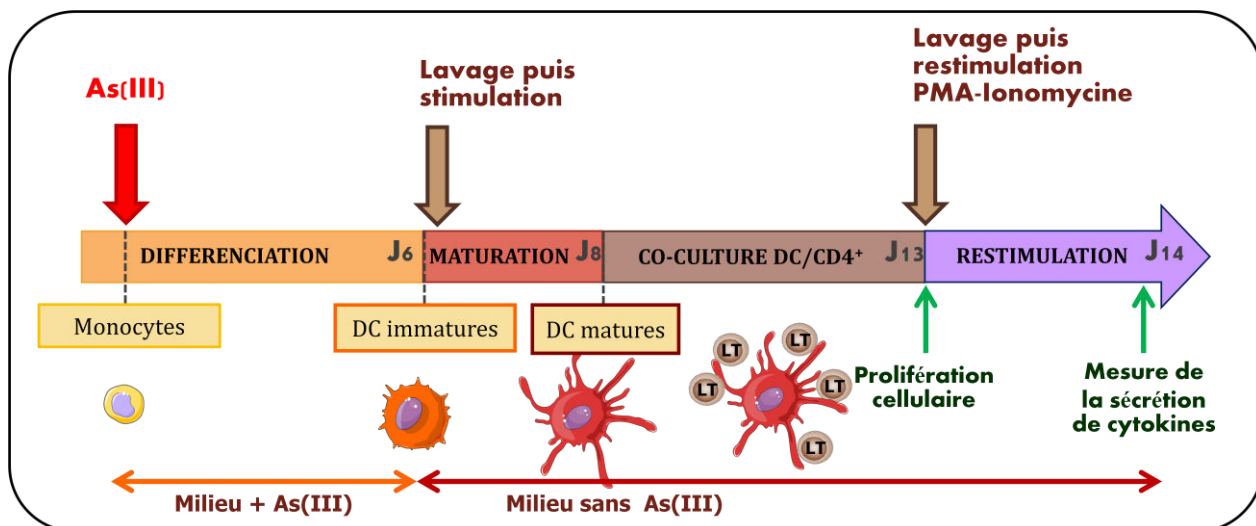


Figure 20: Modèle expérimental employé lors des cocultures de DCs avec des LTs CD4⁺

VI.2 EVALUATION DE LA PROLIFERATION DES LTs EN CO-CULTURE

La prolifération des LTs, cultivés en présence de mDCs, a été évaluée en utilisant la sonde carboxyfluorescéinediacetatesuccimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes, Carlsbad, USA) qui diffuse passivement dans les cellules. Dans le milieu intracellulaire, l'hydrolyse de la sonde par les estérases endogènes génère la forme fluorescente du CFSE qui réagit alors de manière stable avec les fonctions amines des protéines intracellulaires. Ces réactions permettent la genèse de composés fluorescents fixés à la cellule. Ainsi, lors des divisions successives, la fluorescence est répartie de façon équitable entre les deux cellules filles, ce qui permet d'évaluer le nombre de divisions.

Les LTs CD4⁺ ont été marqués au CFSE (0,25 μ M) pendant 10 min à 37°C. A l'issue de cette incubation, les LTs CD4⁺ sont lavés et incubés à 37°C pendant 1 h dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté avec du SVF-DC (10%_(V/V)) (Invitrogen), de la pénicilline (100 IU/mL) et de la streptomycine (100 μ g/mL) (Invitrogen). Les LTs CD4⁺ (500 000 cellules) sont ensuite mis en culture avec un nombre variable d'iDCs, de mDCs ou de mDCs préalablement différenciées en présence d'As(III) à 0,25 μ M, en utilisant les ratios DC: LT suivant : 1:5, 1:10 et 1:25. La prolifération des LTs a été évaluée par cytométrie en flux (FL-1) en déterminant le pourcentage de LTs ayant une MFI au moins deux fois plus faible que celle des LTs quiescents.

VII. QUANTIFICATION DES NIVEAUX DE CYTOKINES SECRETEES PAR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

La quantité de cytokines sécrétées dans les milieux de culture cellulaire par les mDCs ou les LTs CD4⁺ a été quantifiée selon la méthode ELISA. Des kits commerciaux ont été utilisés pour chacune des cytokines dosées: DuoSet® Human IL-12p70, IL-12/23p40, IL-23, IL-6, IL-17 et IFN- γ (R&D Systems™, Minneapolis, USA). Les dosages ont été effectués en duplicat pour chaque échantillon, selon les instructions du fournisseur.

La quantification de la cytokine est déterminée par une réaction colorimétrique, catalysée par l'enzyme HRP (Horseradish Peroxydase) couplée à l'anticorps de détection de la protéine d'intérêt. Après l'ajout de substrats (peroxyde d'hydrogène et tetraméthylbenzidine stabilisés, R&D Systems™), la réaction catalysée par l'HRP est stoppée au bout de 20 min avec l'addition d'une solution d'acide sulfurique à 3 N. Les échantillons sont ensuite lus au spectrophotomètre (Spectrostar Nano, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) à la longueur d'onde de 450 nm et corrigée à la longueur d'onde de 540 nm.

VIII. DETECTION DES EAOs

La détection des EAOs a été effectuée en marquant les cellules avec la sonde DHR (Dihydrorhodamine 123) (Molecular Probes), dont l'oxydation produit un composé fluorescent, la rhodamine 123. Cette sonde est non spécifique ; elle détecte non seulement différentes EAOs (H₂O₂, anion superoxyde O₂⁻) mais également des espèces activées de l'azote comme le peroxynitrite ONOO⁻ qui est formé par la réaction du NO avec O₂⁻ (Gomes et al., 2005).

Les iDCs recueillies à J6 sont prétraitées 2 h avec de l'As(III) (2 μ M) ou du tBHQ (10 μ M), puis stimulées ou non pendant 1 h avec du LPS (25 ng/ml). Les cellules sont ensuite incubées avec la DHR (10 μ M) pendant 30 min à 37°C, puis analysés en FL-1 avec le cytomètre FC-500. L'analyse des cellules non marquées permet de déterminer l'autofluorescence spontanée des DCs qui est soustraite aux valeurs MFI de chaque échantillon incubé avec la DHR.

IX. ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE

IX.1 EXTRACTION ET DOSAGE DES ARNs

Les ARNs sont extraits à l'aide d'une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine, le TRIzol® (Invitrogen), qui permet d'isoler les ARN totaux de l'ADN et des protéines tout en conservant leur intégrité lors de la lyse cellulaire.

Les cellules sont lavées avec du PBS et lysées dans 1 ml de TRIzol®. L'addition de 200 µl de chloroforme permet après centrifugation (14000g, 15 min, 4°C) la séparation de deux phases : une phase aqueuse et une phase organique. La phase aqueuse, contenant les acides nucléiques, est recueillie et 500 µl d'isopropanol y sont ajoutés provoquant ainsi la précipitation des ARNs, lesquels sont ensuite récupérés par centrifugation (14000g, 10 min, 4°C). Le culot d'ARN est alors lavé deux fois par de l'éthanol 70% puis séché et dissous dans 15 à 30 µl d'eau stérile filtrée, selon la taille du culot. Ils sont ensuite conservés à -20°C. Les ARNs sont dosés à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop ND1000 (Thermo Fischer ScientificInc, Waltham, USA) qui permet la mesure de l'absorbance des acides nucléiques à 260 nm. Le rapport d'absorbance 260/280 nm est mesuré pour chaque échantillon afin de vérifier la bonne qualité de l'extraction.

IX.2 TRANSCRIPTION INVERSE (RT)

La transcription inverse des ARN obtenus est effectuée à l'aide du kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription kit » d'Applied Biosystems (Invitrogen). Le mélange réactionnel de 20 µl comprend : 0,5 ou 1 µg d'ARN dilués dans 10 µl d'eau stérile, 2 µl de tampon de réaction 10X, des dNTPs (4 mM), 2 µl de d'amorces aléatoires (pour une concentration finale de 0,3 µM) et 1 µl de reverse transcriptase recombinante issue du virus de la leucémie murine de Moloney (rMoMuLV) (2,5 U/µl finale). La réaction de RT commence par un passage de 10 min à 25°C puis est poursuivie à 37°C pendant 2 h. Le mélange réactionnel issu de la RT est dilué dans de l'eau stérile pour obtenir une concentration finale d'ADNc de 10 ng/µl.

IX.3 REACTION DE POLYMERISATION QUANTITATIVE EN TEMPS REEL (Q-PCR)

La PCR permet l'amplification de l'ADNc, grâce à des amorces sens et antisens spécifiques des gènes étudiés. La PCR quantitative effectuée dans notre laboratoire repose sur la détection et la quantification d'un agent fluorescent, le SYBR®Green I, qui s'intercale préférentiellement dans l'ADN double brin néosynthétisé. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle à l'aide d'un microspectrofluorimètre couplé au thermocycleur (ABI PRISM 7300,

Applied Biosystems). La quantification de la fluorescence est basée sur l'évaluation du cycle seuil (Cycle threshold, Ct) qui permet de déterminer pour chaque gène le cycle d'amplification à partir duquel l'intensité de fluorescence émise est supérieure à la fluorescence de base. Les résultats sont normalisés par rapport à un gène de ménage, ici le 18S, dont l'expression reste stable selon les conditions de culture. Cette normalisation permet de déterminer la variation d'expression relative des gènes d'intérêt entre les cellules témoins et les cellules traitées.

Le mélange réactionnel de la PCR contient 2,5 ng de produit de RT repris dans de l'eau stérile (2,5 ng/réaction), en considérant que tout l'ARN a été rétrotranscrit. Il contient aussi 0,3 µM de chaque amorce et 10 µl de SYBR®Green PCR master Mix (contenant du MgCl₂, l'ampliTaq Gold® DNA Polymerase et les dNTPs) (AppliedBiosystems). La liste des amorces utilisées, commandées chez Sigma Aldrich ou Eurogentec (Liège, Belgique), est présentée dans le Tableau 4. Chaque échantillon est testé en duplicat dans une plaque de 96 puits. La réaction comporte une étape de dénaturation initiale (95°C, 10 min), puis 40 cycles, comprenant chacun une étape de dénaturation de l'ADN double brin (95°C, 15 sec) et une étape d'hybridation des amorces à l'ADN simple brin et d'élongation (60°C, 1 min). La variation d'expression des gènes entre les différentes conditions étudiées est présentée en moyenne de Ct corrigée par le gène de ménage (18S), calculée selon la formule suivante :

$\text{Taux d'expression des transcrits} = 2^{(\text{Ct gène-Ct référence}) \text{ témoin} - (\text{Ct gène-Ct référence}) \text{ traité}}$

X. ANALYSE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE PAR WESTERN-BLOT.

X.1 *PREPARATION DES ECHANTILLONS ET DOSAGE DES PROTEINES*

Les protéines cellulaires totales sont extraites dans du tampon RIPA contenant du Tris-HCL (50 mM, pH 8), du NaCl (150 mM), de l'EDTA (5 mM), du NaF (50 mM), du Triton® X-100 (1% (v/v)), du sodium deoxycholate (0,5% (m/v)) et du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (0,1% (v/v)), le tout supplémenté avec du phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) (1 mM), de la leupeptine (5 µg/ml), de l'aprotinine (0,5 µg/ml), du dithiothreitol (DTT) (0,5 mM), et de l'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄) (1 mM). Après incubation des échantillons avec rotation pendant 30 min à 4°C, les débris membranaires issus de la lyse sont séparés du lysat cellulaire par centrifugation (5 min, 14000g, 4°C). Après recueil du surnageant, le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford par mesure spectrophotométrique à la longueur d'onde de 595 nm.

X.2 ELECTROPHORESE SUR GEL ET TRANSFERT SUR MEMBRANE

Entre 30 μ g et 45 μ g de protéines sont déposées par conditions et séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, selon la méthode SDS-PAGE (“Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis”). Le gel inférieur à 10% (dit de séparation) est composé comme suit : Acrylamide/ Bisacrylamide 19 :1 (Eurobio, Courtaboeuf, France) (10%_(V/V)) ; Tris-HCl (0,39 M pH 8,6) ; TEMED (0,5%_(V/V)) ; persulfate d’ammonium (0,05%_(M/V)). Le gel supérieur à 4% (dit de concentration) est composé de : Acrylamide (4%_(V/V)) ; Tris-HCl (0,13 M pH 6,6) ; TEMED (0,5%_(V/V)) ; persulfate d’ammonium (0,05%_(M/V))

Avant le dépôt des protéines, un tampon de charge (Tris-HCl (0,5 M), glycérol (25%_(V/V)), bleu de Bromophénol (0,01%_(V/V)), SDS (2%_(V/V)), et β -mercaptoéthanol (5%_(V/V))) est ajouté à l’échantillon, qui est ensuite chauffé 10 min à 95°C, dans le but de dénaturer les protéines. Les protéines de l’échantillon sont ensuite soumises à une électrophorèse (15 min à 50 V, 15 min à 75 V et 1h30 à 110 V) en présence d’un marqueur de poids moléculaire dans un tampon de migration (Tris (24,7 mM), glycine (198 mM) et SDS (0,1%_(M/V))). Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (Pall Corporation, NY, USA) en milieu liquide (tampon de migration supplémenté en éthanol (20%_(V/V)), à 30 V à 4°C pendant la nuit.

Gène	Nom	Amorcesens	Amorce anti-sens	Fournisseur
h 18S	ARN 18S	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	5'-TTGGCAAATGCTTTCGCTC	SIGMA-ALDRICH
h ATF3	Activating Transcription Factor 3	5'AAGAACGAGAAGCAGCATTGTGAT	5'TTCTGAGCCCGGACAATACACAC	SIGMA-ALDRICH
h CCL22	CC Chemokine type 22	5'ATTACGTCCGTTACCGTCTG	5'TAGGCTCTTCATTGGCTCAG	SIGMA-ALDRICH
h CXCL10	CXC Chemokine type 10	5'CCACGTGTTGAGATCATTGGC	5'TTCTTGATGGCCTTCGATTC	SIGMA-ALDRICH
h CXCL11	CXC Chemokine type 11	5'CCTGGGGTAAAAGCAGTGAA	5'CTCCTGGGGATGTGTAATGG	SIGMA-ALDRICH
h CXCL12	CXC Chemokine type 12	5'GCCCTCCATGGCATACATAGG	5'TGGGATTTAGGCATCGTTGT	SIGMA-ALDRICH
h HMOX1	Hemeoxygenase 1	5'ACTTTCAGAAGGGCCAGGT	5'TTGTTCGCTCAATCTCCT	SIGMA-ALDRICH
h IDO1	Idoleamine 2,3 dioxygenase 1	GCGCTGTTGGAAATAGCTTC	CAGGACGTCAAAGCACTGAA	SIGMA-ALDRICH
h IL1β	Interleukine 1β	5'GGGCCTCAAGGAAAAGAATC	5'TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA	SIGMA-ALDRICH
h IL6	Interleukine 6	5'AGGCACTGGCAGAAAACAAC	5'TTTTACCAGGCAAGTCTCC	SIGMA-ALDRICH
h IL8	Interleukine 8	5' AAGAAACCACCGGAAGGAAC	5'AAATTTGGGGTGGAAAGGTT	EUROGENTEC
h IL10	Interleukine 10	5'CCTGGAGGAGGTGATGCCCCA	5'CCTGCTCCACGGCCTTGCTC	SIGMA-ALDRICH
h IL12A	Interleukine 12 (sous-unité p40)	5'GAGGCCTGTTTACCATTGGA	5'TACTAAGGCACAGGGCCATC	SIGMA-ALDRICH
h IL12B	Interleukine 12 (sous-unité p35)	5'CTCGGCAGGTGGAGGTCAGC	5'TTGCGGCAGATGACCGTGGC	SIGMA-ALDRICH
h IL23A	Interleukine 23 (sous-unité p19)	5'ATTTTACAGGGGAGCCTTC	5'GACTGAGGCTTGGAATCTGC	SIGMA-ALDRICH
h GCLM	Glutamate Cystéine Ligase (sous-unité régulatrice)	5'GCGAGGAGCTTCATGATTGT	5'CTGGAAACTCCCTGACCAA	SIGMA-ALDRICH
h NQO1	NADPH quinone oxydoréductase 1	5'GCCGCAGACCTTGTGATATT	5'TTTCAGAATGGCAGGGACTC	SIGMA-ALDRICH
h TNFα	Tumor Necrosis Factor α	5'AACCTCCTCTCTGCCATC	5'ATGTTTCGTCCTCCTCACA	EUROGENTEC

Tableau 4 : Primers utilisés lors des analyses par q-PCR

X.3 DÉTECTION DES PROTÉINES D'INTÉRÊTS

Après blocage avec une solution de T-TBS (Tris (0,5 M) pH 7,4), NaCl (1,5 M), TWEEN-20 (0.1%_(V/V))) supplémenté en BSA (5%_(M/V))(Sigma-Aldrich), la membrane est ensuite hybridée pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires d'intérêts dilués au 1/1000^{ème} dans du TBS (Tris (0,5 M) pH 7,4), NaCl (1,5 M)), supplémenté avec de l'albumine sérique bovine (5%_(M/V)). Après des lavages au T-TBS, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (DakoDenmark A/S, Glostrup, Danemark) dilué au 1/2000^{ème} dans du T-TBS et de la BSA (5%_(M/V)). Ce protocole a été utilisé pour la détection de toutes les protéines excepté Nrf2. En effet, pour la détection de la protéine Nrf2, la membrane est mise à incuber dans du T-TBS supplémenté avec du lait écrémé (5%_(M/V)), et ensuite hybridée avec l'anticorps primaire dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS seul sur la nuit à 4°C. Après des lavages au T-TBS, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin (Dako) dilué au 1/2000^{ème} dans du T-TBS avec du lait écrémé (5%_(M/V)). Les anticorps utilisés pour la détection des protéines d'intérêt sont référencés dans le Tableau 5.

Anticorps primaire	Fournisseur et référence	Espèce	Poids moléculaire apparent
ATF3	Santa Cruz (C-19)	lapin	≈ 21 kDa
IκB-α	Cell Signaling (9242S)	lapin	≈ 39 kDa
HO-1	Enzo Life Science (ADI-SPA-895)	lapin	≈ 32 kDa
Nrf2	Santa Cruz (H-300)	lapin	≈ 90-110 kDa
Phospho-IκB-α	Cell Signaling (2859S)	lapin	≈ 40 kDa
Phospho-p38	Cell Signaling (9211S)	lapin	≈ 43 kDa
Phospho-ERK	Cell Signaling (9106S)	souris	≈ 42, 44 kDa
Phospho-JNK	Cell Signaling (9255S)	souris	≈ 46, 54 kDa
p38	Santa Cruz (C-20)	lapin	≈ 38 kDa
p62 (SQSTM1)	Santa Cruz (D-3)	souris	≈ 65 kDa
p65	Santa Cruz (H-286)	lapin	≈ 65 kDa
p300	Santa Cruz (C-20)	lapin	≈ 300 kDa
IRF3	Santa Cruz (SL-12)	souris	≈ 50 kDa
NQO1	Santa Cruz (A-5)	souris	≈ 31 kDa

Tableau 5 : Anticorps utilisés dans la détection de protéines d'intérêt par Western-Blot

L'expression des protéines est ensuite révélée par chimioluminescence en incubant la membrane pendant 1 min avec la solution suivante : Tris (0,1 M pH 8,5), acide coumarique (0,225 mM), luminol (1,25 mM), H₂O₂ (2,49 mM). Le signal est visualisé au PhosphorImager (Fujifilm) et son intensité est ensuite mesurée par densitométrie en utilisant le logiciel MultiGauge.

XI. EXTRACTION NUCLÉAIRE

Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de 3 millions de DCs par conditions selon les instructions du fournisseur, avec le kit commercial « NuclearExtract Kit » (Active Motif, Rixensart, Belgium)

Après les traitements, les cellules sont recueillies et lavées deux fois avec du PBS froid supplémenté avec 5%_(V/V) de tampon inhibiteur de phosphatase (NaF (125 mM), β -glycerophosphate (250 mM), para-nitrophenyl phosphate (250 mM), orthovanadate (25 nM)). Après centrifugation, les cellules sont reprises et incubées 15 min sur glace dans du tampon hypotonique (Hepes (20 mM pH 7,5), NaF (5 mM), Na₂MoO₄ (10 μ M), EDTA (0,1 mM)). Du Nonidet p-40 (0.5%_(V/V)) est ensuite ajouté aux échantillons, lesquels sont agités vigoureusement pendant 10 sec, et centrifugés 30 sec à 14 000g. Les extraits cytosoliques sont recueillis, et les culots qui contiennent les fractions nucléaires sont incubés 30 min à 4°C avec agitation dans du tampon de lyse (fourni par le kit) supplémenté avec du DTT (1 mM) et des inhibiteurs de protéases (1%_(V/V)). Après une centrifugation de 10 min à 14000g, les extraits nucléaires contenus dans le surnageant sont recueillis. Les concentrations protéiques présentes dans chacune des fractions sont déterminées par la méthode de Bradford, puis les extraits nucléaires et cytosoliques sont stockés à -80°C.

XII. DETERMINATION DE LA LIAISON DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION A LEUR ELEMENTS DE REPONSE PAR LA METHODE DU TRANSAM

La liaison des facteurs de transcription p65, IRF3, Sp1, et Nrf2 à leurs éléments de réponse sur l'ADN a été mesurée à l'aide du kit commercial TransAM® (Active Motif, Rixensart, Belgique) dont le principe est dérivé de l'ELISA. Le fonctionnement de ce kit repose sur la fixation des facteurs de transcription d'intérêt sur des oligonucléotides correspondant à des séquences consensus de leurs éléments de réponse, immobilisés dans des plaque 96 puits, puis à leur détection via des anticorps spécifiquement dirigés contre eux.

L'évaluation de la liaison des facteurs de transcription à leurs éléments de réponse se fait à température ambiante selon les instructions du fournisseur, à partir de 5 à 7 μ g d'extraits nucléaires. Le protocole de détection est résumé dans la Figure 21. Les dilutions des anticorps primaires et secondaires utilisées sont au 1/1000^{ème}. L'anticorps secondaire, couplé à la HRP, permet la réaction colorimétrique suite à l'ajout de substrats (fournis dans le kit). La réaction est stoppée après 5 à 20 min selon l'intensité de la coloration avec de l'acide sulfurique à 3 N. Les échantillons sont ensuite lus au spectrophotomètre (Spectrostar nano, BMG Labtech) à la longueur d'onde de 450 nm et

corrigée à la longueur d'onde de 540 nm. La liaison des facteurs de transcription à leurs éléments de réponse est évaluée de manière relative en comparant les densités optiques obtenues pour les différentes conditions testées, après soustraction des densités optiques obtenues pour le blanc.

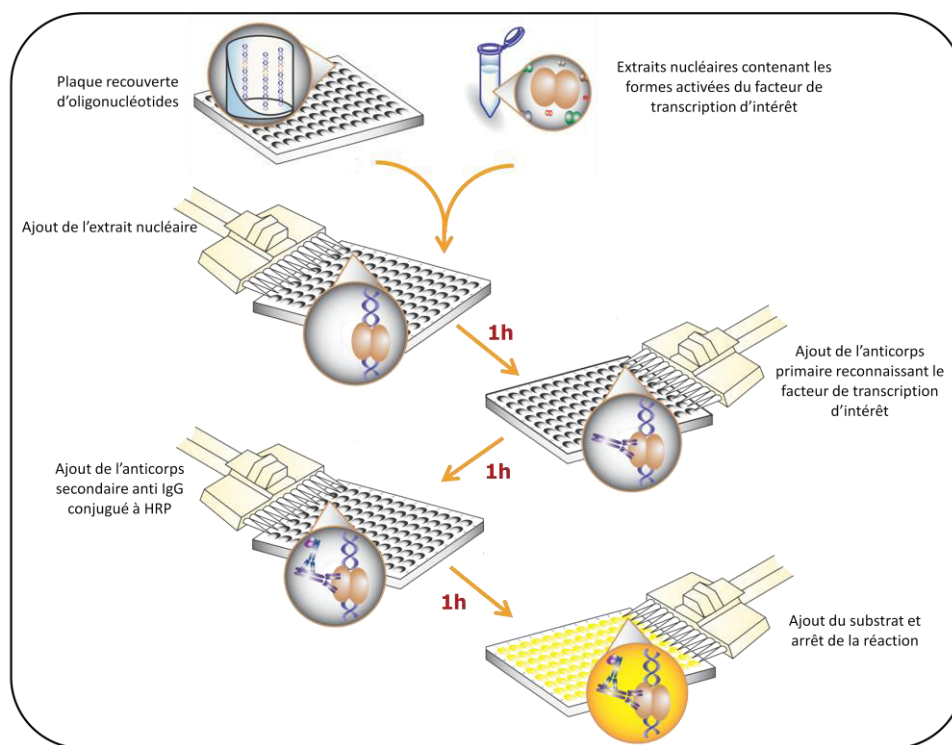


Figure 21: Principe utilisé lors de l'évaluation de la liaison des facteurs de transcription à leurs éléments de réponse
D'après www.activemotif.com

XIII. EXTINCTION DE Nrf2 PAR TRANSFECTION DE siRNA

Les DCs ont été transfectées avec des siRNA ciblant 3 variants d'ARNm codant pour Nrf2 (SMARTpool® ON-TARGETplus NFE2L2 siRNA, Dharmacon, Lafayette, USA) à l'aide d'un transfectant lipidique. 4 millions de DCs par condition, ont été transfectées à J5 lors du processus de différenciation des monocytes.

Le transfectant utilisé, la Lipofectamine® RNAiMAX (In Vitrogen), est diluée dans du milieu OptiMEM® (Gibco) selon les instructions du fournisseur, soit 1 µL de lipofectamine pour 16,67 µL d'OptiMem. Les siRNA ciblant Nrf2, ainsi que des siRNA contrôle (ON-TARGETplus Non targetting control siRNA, Dharmacon) sont dilués dans du milieu OptiMem à la concentration de 1 µL de siRNA pour 50 µL d'OptiMem, selon les instructions du fournisseur. La lipofectamine et les siRNAs dilués sont ensuite mis en contact pendant 5 min à température ambiante, puis le complexe siRNA-lipofectamine est ajouté dans les puits contenant les cellules à la concentration de 150 pmol

de siRNA pour 1 million de DCs. Les cellules sont laissées en contact avec siRNA pendant 18 h dans un milieu contenant de l'IL-4 (50 ng/mL) et du GM-CSF (500 IU/mL) afin de terminer la différenciation des iDCs. Puis, les cellules sont lavées et traitées. Pour cela, les cellules sont comptées et diluées à la concentration de 1 000 000 cellules/mL dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté avec du SVF-DC (10% (V/V)) (Invitrogen), de la pénicilline (100 IU/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL) (Invitrogen).

XIV. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD (Standard Deviation). Les analyses statistiques ont été réalisées par le t-test de Student ou par le test de comparaison multiple de Dunnett précédé d'une ANOVA. Une différence entre les moyennes a été considérée comme significative lorsque $p < 0.05$ (*, $p < 0,05$).

I.1 EFFETS D'As(III) SUR L'EXPRESSION MEMBRANAIRE DES MARQUEURS DE DIFFERENCIATION DES iDCs

Nous avons en premier lieu étudié les effets de concentrations croissantes d'As(III), comprises entre 0,1 μ M et 2 μ M, sur l'expression membranaire des marqueurs de différenciation des iDCs, tels que le DC-SIGN et le CD1a. DC-SIGN favorise l'adhérence des DCs aux LTs puis leur activation alors que CD1a est une molécule du CMH de classe 2. Classiquement, l'expression de ces deux marqueurs est fortement induite dans les iDCs différenciées en présence de GM-CSF et d'IL-4. Concernant l'arsenic, les concentrations d'As(III) les plus basses (0,1 à 0,5 μ M) sont en relation avec les taux plasmatiques de métalloïde mesurés chez les individus exposés de manière environnementale par l'ingestion d'eau de consommation contaminée (Pi et al., 2000; Wu et al., 2003). Les concentrations de 0,1 à 2 μ M d'As(III) correspondent également aux valeurs plasmatiques mesurées chez les patients souffrant d'APL et traités par le Trisenox (As_2O_3). Les monocytes ont été différenciés en iDCs par un traitement de 6 jours avec de l'IL-4 et du GM-CSF, en absence ou présence de concentrations croissantes d'As(III). Le métalloïde a été ajouté une seule fois à l'ensemencement des monocytes. La Figure 22A montre que les concentrations d'As(III) > 0,5 μ M diminuent significativement l'intensité du marquage membranaire de DC-SIGN ainsi que le pourcentage de cellules exprimant ce marqueur. La chute de l'expression membranaire du DC-SIGN est respectivement de 32% et de 80% dans les iDCs différenciées en présence de 1 μ M et 2 μ M d'As(III). De plus, le traitement des cellules avec 2 μ M d'As(III) réprime très fortement l'induction de l'expression de la protéine CD1a. De telles diminutions de l'expression membranaire de DC-SIGN et de CD1a résultent probable soit d'un blocage global de la différenciation des monocytes en iDCs ou bien d'effets cytotoxiques directs d'As(III). Afin de discriminer ces deux hypothèses, nous avons ensuite évalué l'expression membranaire de CD14, un corécepteur du LPS caractéristique de la population monocyttaire, qui est réprimée lors de la différenciation des iDCs. Si l'As(III) bloque spécifiquement les processus de différenciation des monocytes en iDCs, il devrait alors prévenir la répression de l'expression membranaire du CD14. La Figure 22B indique qu'As (III) ne supprime pas la répression de l'expression du CD14 ; il est donc plus probable qu'aux concentrations de 1 et 2 μ M, le métalloïde inhibe la différenciation des monocytes par des effets cytotoxiques directs.

Afin de vérifier cette seconde hypothèse, nous avons déterminé la viabilité des iDCs exposées au métalloïde durant les 6 jours de différenciation. Aux concentrations de 1 μ M et 2 μ M, As(III) diminue significativement le nombre de cellules recueillies après 6 jours de culture (Figure 23A,

gauche). Le marquage des cellules au bleu trypan montre que ces deux concentrations réduisent la viabilité des iDCs d'environ 40% (Figure 23A, droite). La cytotoxicité de l'arsenic a été confirmée par cytométrie en flux en quantifiant la liaison à l'ADN de l'iodure de propidium (PI) dans les cellules nécrosées. La Figure 23B montre que les concentrations d'As(III) les plus fortes (1 μ M et 2 μ M), augmentent significativement le pourcentage de cellules marquées au PI. A l'instar des résultats obtenus avec le test au bleu trypan, environ 40% de cellules nécrotiques sont détectées parmi les iDCs différenciées en présence de 2 μ M d'As (III).

1.2 EFFETS D'AS(III), A DOSES NON CYTOTOXIQUES, SUR LA FONCTION D'ENDOCYTOSE DES IDCs

Nous avons ensuite déterminé si les concentrations non cytotoxiques d'As(III), comprises entre 0,1 μ M à 0,5 μ M, altèrent les capacités d'endocytose des iDCs. Cette propriété est en effet une fonction majeure des iDCs. L'endocytose a été évaluée, par cytométrie en flux, en quantifiant la capture de billes de FITC-dextran par les iDCs. La Figure 24 montre que la différenciation des iDCs en présence de 0,5 μ M As(III) diminue légèrement l'endocytose des billes de FITC-dextran. Cependant aucune concentration d'As(III) testée n'affecte le pourcentage des iDCs capturant ces billes.

1.3 EFFETS D'AS(III) SUR L'EXPRESSION MEMBRANAIRE DES MARQUEURS DE MATURATION DES DCs

Pour obtenir des cellules activées matures ou mDCs, les iDCs, différenciées en absence ou en présence de concentrations non cytotoxiques d'As(III), ont été stimulées avec du LPS (*Escherichia coli* 055 :B5) pendant 24 h dans un milieu de culture sans As(III). La maturation des iDCs est notamment caractérisée par l'expression membranaire des molécules de costimulation CD80 et CD86, ainsi que du marqueur CD83 (Figure 25). La différenciation des iDCs en présence d'As (III), n'a pas, ou a très peu d'effets, sur l'induction de l'expression membranaire de ces marqueurs. En effet, comme indiqué sur la Figure 26, seule la concentration de 0,5 μ M d'As(III) diminue faiblement mais significativement l'expression de CD80 et de CD86, sans réduire cependant le pourcentage de cellules exprimant ces marqueurs.

1.4 AS(III) REPRIME L'EXPRESSION DE L'IL-12P70 ET DE L'IL-23 DANS LES MDCs

Une autre fonction majeure des mDCs est la production et la sécrétion de différentes ILs lors de la stimulation par des agonistes des récepteurs TLRs. Nous avons donc comparé la capacité des DCs, différenciées en absence ou en présence d'As(III), à sécréter l'IL-12p40, l'IL-12p70, l'IL-23 et l'IL-6, lorsque ces cellules sont stimulées pendant 24 h avec du LPS, associé ou non à de l'IFN- γ , dans un milieu de culture sans As(III). La Figure 27A montre clairement que l'As(III) inhibe très fortement la

sécrétion de ces quatre cytokines. L'IL-12p40 est une sous-unité pouvant s'associer avec les sous-unités IL-12 p35 ou IL-23p19, pour former respectivement l'IL-12p70 et l'IL-23, qui sont les cytokines biologiquement actives. Dès la dose de 0,1 μ M, l'As(III) diminue d'environ 50% la sécrétion d'IL-12p70, qui joue un rôle clé dans la polarisation Th1 des LTs. A 0,25 μ M, As(III) diminue respectivement de 55% et de 70% la sécrétion de l'IL-12p40 et de l'IL-12p70. Cette concentration du métalloïde réprime également, et respectivement de 86% et de 53%, la sécrétion d'IL-23 et d'IL-6, deux cytokines contribuant à la différenciation des LTs naïfs en Th17. Il est démontré que la stimulation combinée des iDCs par le LPS et l'IFN- γ induit de manière optimale l'expression de l'IL-12p40 et de l'IL-12p70 (Snijders et al., 1998). Dans ce cadre, la Figure 27B montre que les quantités d'IL-12p70 et d'IL-23 sécrétées par les DCs, costimulées avec du LPS et de l'IFN- γ , sont respectivement 8,8 fois et 3,5 fois plus importantes, que celles produites lors d'une stimulation avec du LPS seul. Il est intéressant de noter que les effets inhibiteurs d'As(III) à 0,1 μ M, vis-à-vis de la sécrétion d'IL-12p70 et d'IL-23, sont plus puissants sur les DCs costimulées que sur les DCs stimulées avec le LPS seul. A cette faible concentration, As(III) diminue respectivement de 65% et de 70% les sécrétions d'IL-12p70 et d'IL-23.

L'expression des sous-unités IL-23p19, IL-12p35 et IL-12p40 sont respectivement codées par les gènes IL23A, IL12A et IL12B. La stimulation des iDCs pendant 6 h avec du LPS induit de manière significative l'expression de ces trois gènes (Figure 28). Dans notre modèle, le LPS induit également l'expression des gènes codant l'IL-6, diverses chimiokines (CXCL10, CXCL11, CCL22) et IDO-1 (indoleamine 2,3 dioxygénase 1), une enzyme intracellulaire clé régulant l'activité du système immunitaire. La Figure 29A démontre que la différenciation des iDCs avec As(III) 0,25 μ M diminue de manière significative les niveaux d'ARNm des gènes IL12A, IL12B et IL6 dans les mDCs, mais qu'elle n'affecte pas ceux du gène IL23A. De plus, la Figure 29 indique qu'As(III) ne modifie pas l'expression des gènes CXCL11, CCL22 et IDO1 mais qu'il augmente faiblement celle de CXCL10 dans les DCs stimulées par le LPS.

1.5 L'ARSENIC INHIBE SIGNIFICATIVEMENT L'EXPRESSION DES CYTOKINES INDUITES PAR LES AGONISTES DES RECEPTEURS TLR7/8 ET TLR2

Nous avons également étudié les effets d'As(III) sur l'expression d'IL-12p70 et d'IL-23 induite par la stimulation des récepteurs TLR2 et TLR7/8. La Figure 30A montre que la différenciation des DCs en présence d'As(III) 0,25 μ M inhibe significativement la sécrétion d'IL-12p70 induite par le R848, un agoniste du TLR7/8, associé ou non à l'IFN- γ . L'exposition à As(III) diminue également la capacité des DCs à sécréter l'IL-23 lorsqu'elles sont stimulées par le R848 seul. De plus, la Figure 30A indique que, conformément aux données de la littérature, les DCs stimulées avec le zymosan, un

agoniste du TLR2, produisent des niveaux conséquents d'IL-23 mais qu'elles ne secrètent pas d'IL-12p70 lorsqu'elles sont activées en absence d'IFN- γ (Gerosa et al., 2008). La différenciation des DCs en présence d'As(III) 0,25 μ M diminue significativement la sécrétion d'IL-12p70 et d'IL-23 à partir des cellules costimulées par le zymosan et l'IFN- γ . Les effets inhibiteurs d'As(III) sur la sécrétion de ces deux cytokines sont associés à une réduction des niveaux d'ARNm des gènes IL12A, IL12B et IL23A dans les DCs stimulées par le R848 et l'IFN- γ . En revanche, la différenciation des iDCs en présence d'As(III) ne réduit que l'induction des niveaux d'ARNm du gène IL12A dans les cellules stimulées secondairement en présence de zymosan et d'IFN- γ (Figure 30B).

Enfin, nos résultats démontrent qu'As(III) réduit également significativement la capacité des DCs à sécréter de l'IL-12p70 et de l'IL-23 lorsqu'elles sont activées, indépendamment de la stimulation des TLRs, par un cocktail de cytokines (IL-6, IL-1 β et TNF- α) mimant un microenvironnement inflammatoire (Figure 31).

1.6 IMPACT DE LA DIFFERENCIATION DES IDCs EN PRESENCE D'As(III) SUR LA CAPACITE DES MDCs A STIMULER DES LTs CD4⁺ HUMAINS EN CO-CULTURE

Nous avons ensuite déterminé si la différenciation des iDCs en présence d'As(III) pouvait moduler ultérieurement la capacité des DCs matures à activer des LTs CD4⁺ humains en co-culture dans un milieu sans As(III). Pour cela nous avons déterminé l'impact indirect d'As(III) sur la prolifération des LTs CD4⁺ et sur leur capacité à sécréter de l'IFN- γ et de l'IL-17. Comme attendu, nos résultats indiquent que des concentrations croissantes de DCs, préalablement activées par du LPS pendant 48 h, stimulent la prolifération des LTs CD4⁺ en co-culture (Figure 32A). De plus, ils montrent que la différenciation des iDCs en présence de 0,25 μ M d'As(III) n'affecte pas la prolifération des LTs CD4⁺ induite ultérieurement par les mDCs. La Figure 32B démontre que les mDCs, contrairement aux iDCs, augmentent fortement, après 5 jours de co-culture, la capacité des LTs CD4⁺ à sécréter de l'IFN- γ et de l'IL-17 lorsqu'ils sont restimulés pendant 24 h par du PMA associé à la ionomycine. Dans ces conditions expérimentales, la différenciation des iDCs en présence de 0,25 μ M As(III) réduit la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-17 à partir des LTs activés.

Au cours de cette première partie, nos résultats ont démontré, i) que les plus fortes concentrations d'As(III) testées, 1 μ M et 2 μ M, bloquent la production des iDCs en induisant la mort des cellules en voie de différenciation, et ii) que les mDCs, préalablement différenciées en présence de concentrations d'As(III) non cytotoxiques (0,1 à 0,5 μ M), ont une moindre capacité à, d'une part, sécréter des cytokines majeures telles que IL-12p70 et IL-23, et d'autre part à stimuler la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-17 par des LTs CD4⁺ humains en co-culture. Au final, ces résultats montrent donc

que, *in vitro*, As(III) affecte durablement le processus de différenciation des monocytes en iDCs fonctionnels.

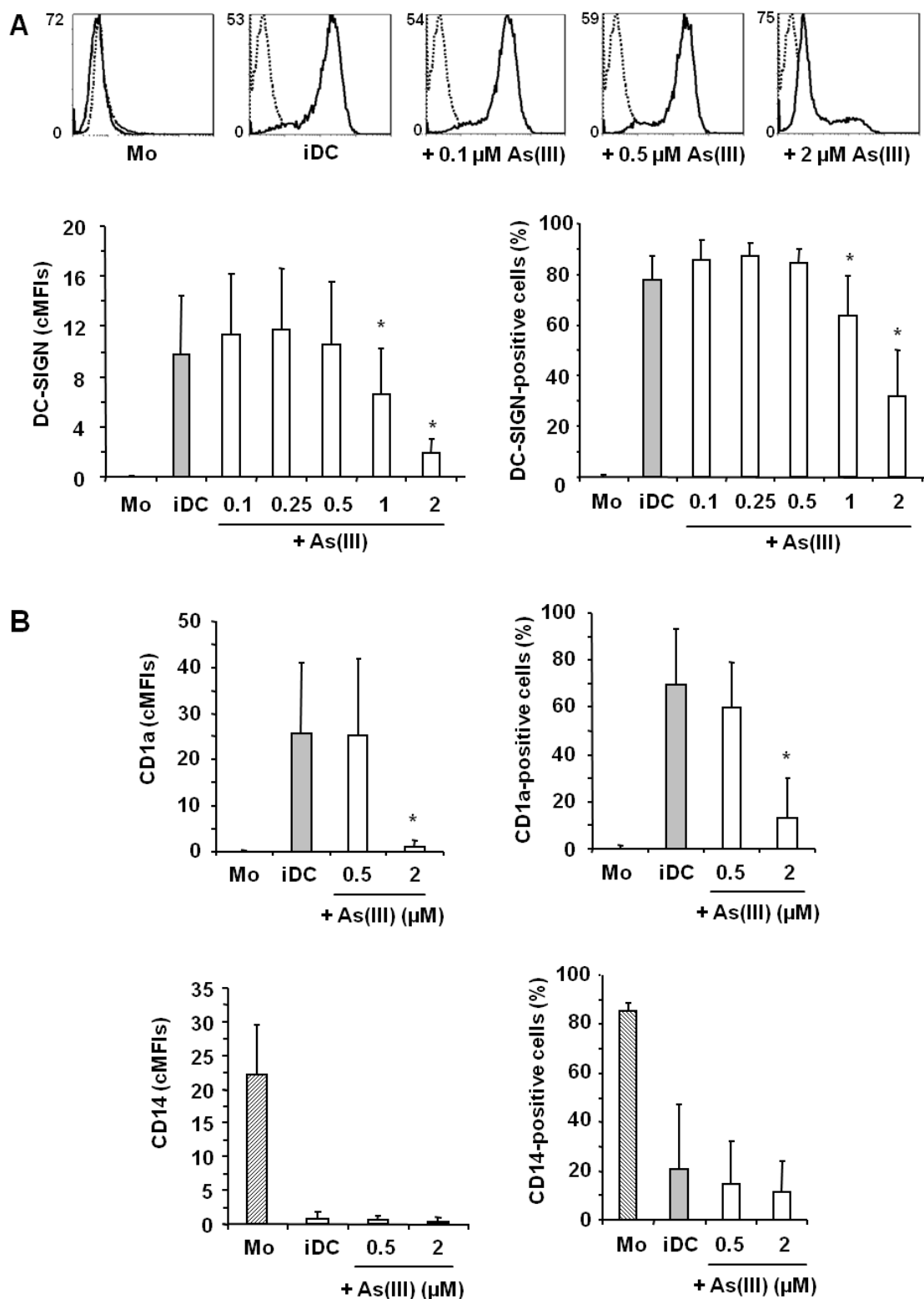


Figure 22: Effet d'As(III) sur l'expression membranaire des marqueurs de différenciation DC-SIGN et CD1a. Les monocytes circulants triés à partir des PBMCs ont été différenciés en iDCs avec du GM-CSF et de l'IL-4 pendant 6 jours, en absence ou en présence de concentrations croissantes d'As(III). L'expression membranaire de DC-SIGN (A), CD1a et CD14 (B) a été analysée par cytométrie en flux. Les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence (cMFIs) ont été calculées en soustrayant les valeurs du contrôle isotypique de celle des MFI bruts. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SD de 8 (A) et 6 (B) expériences indépendantes. * $p < 0.05$, versus iDCs non exposées à As(III).

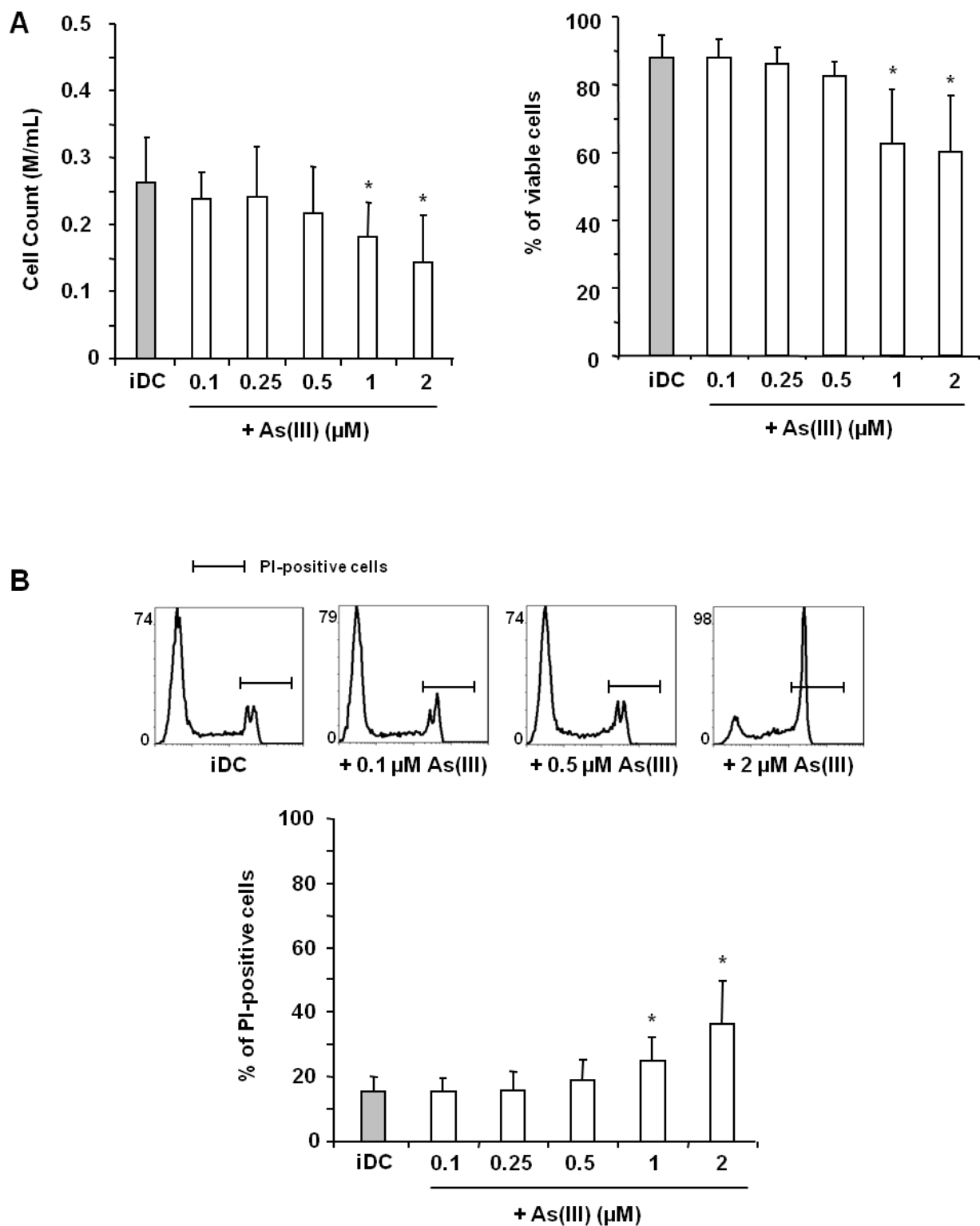


Figure 23: Effets d'As(III) sur la viabilité des iDCs.

Les monocytes ont été différenciés pendant 6 jours en iDCs, en absence ou en présence de concentrations croissantes d'As(III). En (A), le nombre total de cellules récupérées à J6 a été compté manuellement sur lame de Malassez (graphique de gauche), et les pourcentages de cellules viables ont été déterminés par un marquage au bleu trypan. En (B), la viabilité cellulaire a été analysée en cytométrie en flux après une coloration à l'iodure de propidium. Des graphiques représentatifs de l'analyse de la fluorescence détectée par cytométrie en flux sont présentés dans la partie supérieure de la Figure 23B. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD de 6 expériences indépendantes. * $p < 0.05$ versus iDCs non traitées.

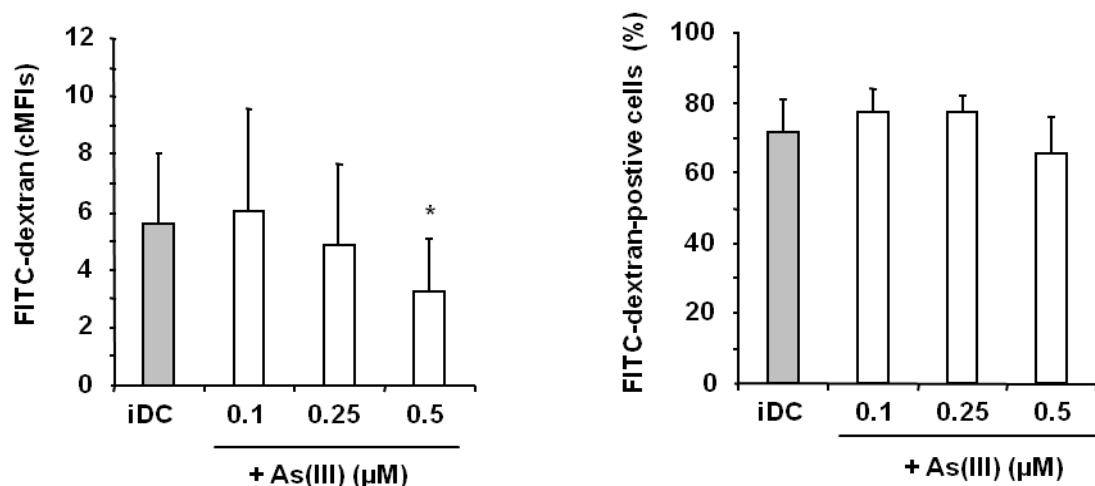


Figure 24: Effet d'As(III) sur les fonctions d'endocytose des iDCs.

Les monocytes ont été différenciés en iDCs avec du GM-CSF et de l'IL-4 pendant 6 jours, en absence ou en présence de concentrations non cytotoxiques d'As(III). Ensuite, les iDCs ont été lavées et incubées avec 1 mg/mL de FITC-dextran (wt 40 000) à 37°C ou à 4°C. La capture du FITC-dextran par les cellules a ensuite été évaluée par cytométrie en flux (10 000 évènements/échantillon) en utilisant le logiciel CXP Analysis. La capture du FITC-dextran est exprimée sous forme de valeurs corrigées d'intensité moyenne de fluorescence (cMFIs), calculées en soustrayant les MFIs mesurés à 4°C de ceux mesurés à 37°C (graphique de gauche). Le pourcentage de cellules ayant capturé les billes de FITC-dextran est lui calculé en soustrayant le % de cellules ayant capturé les billes de FITC-dextran à 4°C du % mesuré à 37°C (graphique de droite). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SD de 4 expériences indépendante. * $p < 0.05$ versus iDCs non traitées.

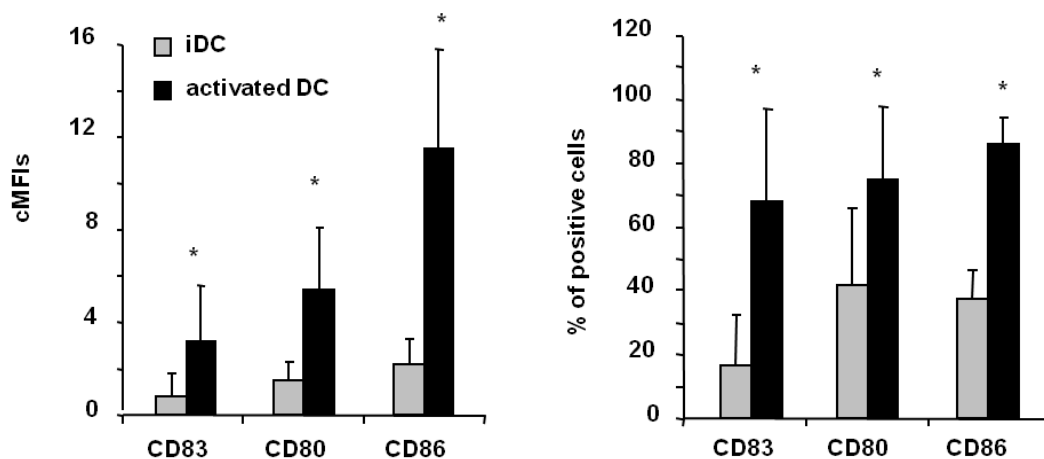


Figure 25: Effet du LPS sur l'expression membranaire des marqueurs de maturation des DCs.

Les monocytes ont été différenciés en iDCs pendant 6 jours en l'absence d'As(III). Puis, les iDCs ont été activées, ou non, avec du LPS (25 ng/mL) pendant 24 h. L'expression membranaire de CD80, CD86 et CD83 a été analysée par cytométrie en flux et quantifiée en comparant les niveaux d'expression des mDCs avec ceux des iDCs. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD de 12 (CD86) et 6 (CD80, CD83) expériences indépendantes. * $p < 0.05$ versus iDCs.

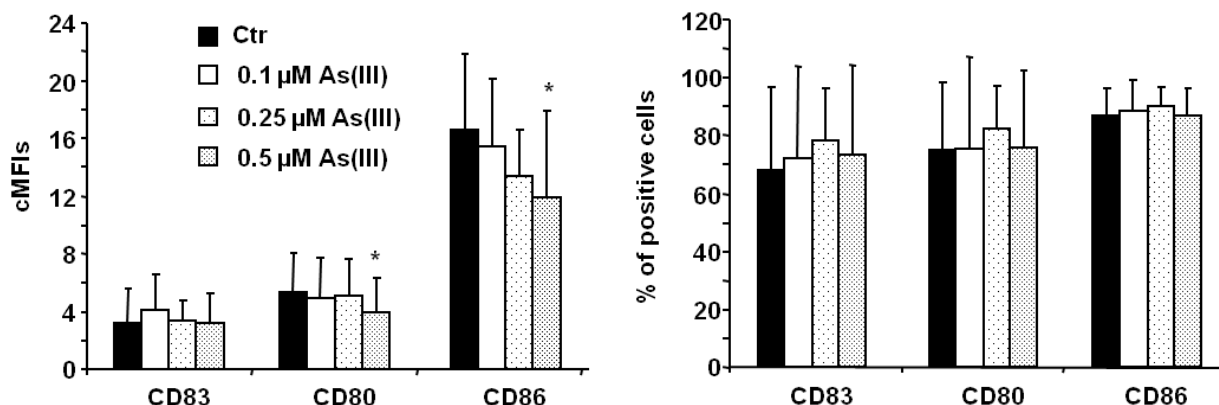


Figure 26: Effet d'As(III) sur l'expression membranaire des marqueurs de maturation induite par le LPS.

Les monocytes ont été différenciés en iDCs pendant 6 jours, en absence ou en présence de concentrations non cytotoxiques d'As(III). Puis, les iDCs ont été lavées et activées avec du LPS (25 ng/mL) pendant 24 h dans un milieu de culture sans As(III). L'expression membranaire de CD80, CD83 et CD86 a été analysée par cytométrie en flux (10 000 événements/échantillon) en utilisant le logiciel CXP Analysis. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD de 6 expériences indépendantes. * $p < 0.05$ versus Ctr.

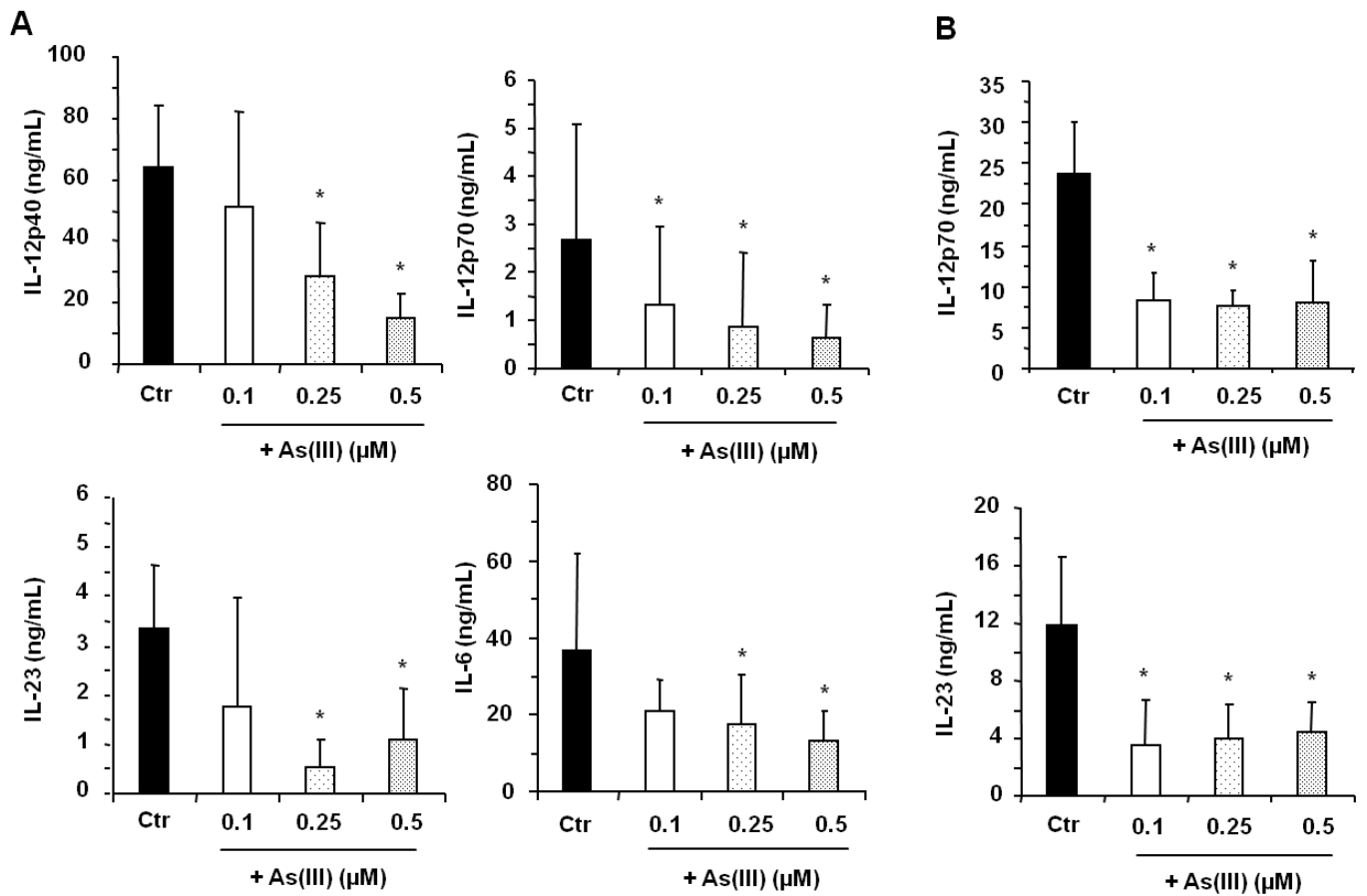


Figure 27:As(III) inhibe la sécrétion d'IL-12p40, d'IL-12p70, d'IL-23 et d'IL-6 dans les mDCs.

Les monocytes ont été différenciés en iDCs avec du GM-CSF et de l'IL-4 pendant 6 jours, en absence (Ctr) ou en présence de concentrations non cytotoxiques d'As(III). Les iDCs ont ensuite été lavées et stimulées avec du LPS (25 ng/mL) (A), ou avec du LPS (25 ng/mL) + IFN- γ (50 ng/mL) (B) pendant 24 h dans un milieu ne contenant pas d'As(III). Les niveaux d'IL-12p40, d'IL-12p70, d'IL-23 et d'IL-6 présents dans les milieux de culture des DCs activées ont été mesurés par ELISA. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD de 8 (IL-12p40), 10 (IL-12p70), 5 (IL-23), 7 (IL-6) (A) et 3 (IL-12p70, IL-23) (B) expériences indépendantes. * $p < 0.05$ versus Ctr.

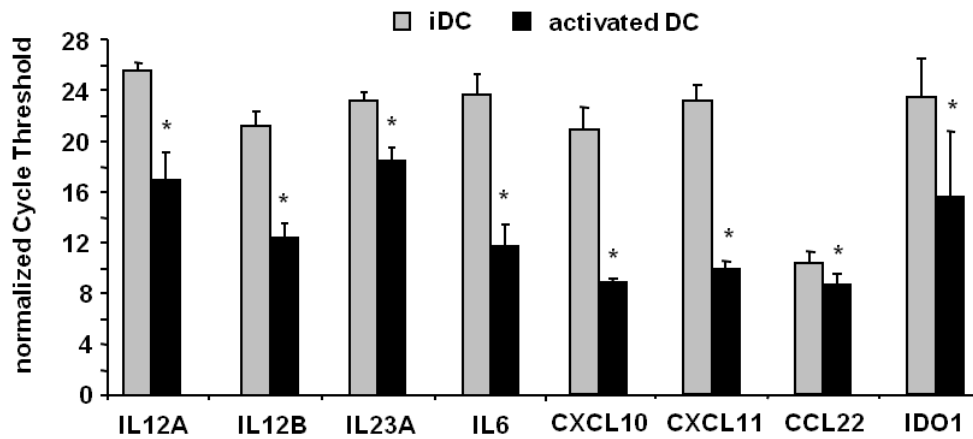


Figure 28: Le LPS induit l'expression de gènes codant différentes cytokines dans les DCs. Les monocytes ont été différenciés en iDCs pendant 6 jours. Puis, les iDCs ont été activées ou non avec du LPS (25 ng/mL) pendant 6 h. Les ARN totaux ont ensuite été isolés, et les niveaux relatifs d'ARNm ont été déterminés par RT-qPCR. Les données sont présentées sous forme de Ct (Cycle Threshold) normalisés (Ct-Ct_{18S}). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD de 5 expériences indépendantes. *p<0.05 versus iDCs.

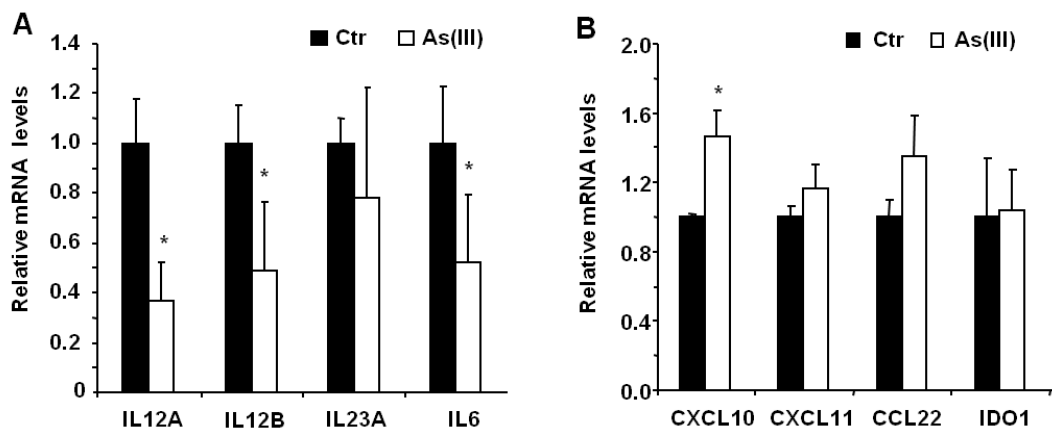


Figure 29 : As(III) réprime l'induction des niveaux d'ARNm des gènes IL12A, IL12B et IL6 dans les DCs stimulées avec le LPS.

Les monocytes ont été différenciés en iDCs pendant 6 jours, en absence (Ctr) ou en présence de 0,25 μ M d'As(III). Ensuite, les iDCs ont été lavées et stimulées avec du LPS (25 ng/mL) pendant 6 h dans un milieu ne contenant pas d'As(III). Les ARN totaux ont été isolés et les niveaux d'ARNm ont été déterminés par RT-qPCR. Les données sont exprimées par-rapport aux niveaux d'ARNm des DCs Ctr arbitrairement fixés à 1. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD de 5 (A) et 4 (B) expériences indépendantes. *p<0.05 versus Ctr.

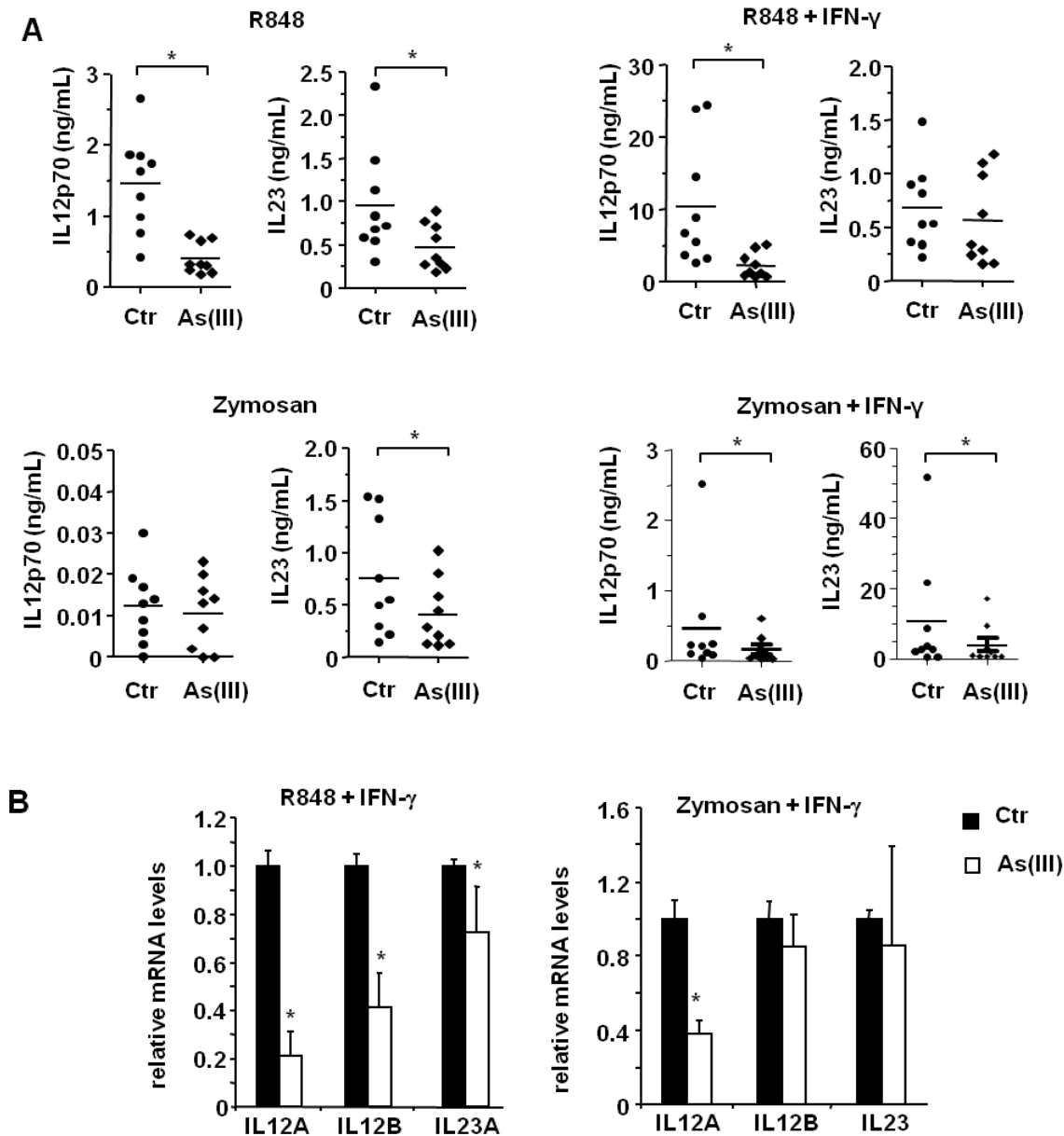


Figure 30 : As(III) inhibe la sécrétion d'IL-12p70 et d'IL-23 des DCs stimulées avec des agonistes des TLR7/8 ou TLR2.

Les monocytes ont été différenciés en iDCs pendant 6 jours en absence (Ctr) ou en présence de 0,25 μ M d'As(III). Ensuite, les iDCs ont été lavées et stimulées avec du R848 (3 μ g/mL) ou du zymosan (10 μ g/mL), en absence ou en présence d'IFN- γ (50 ng/mL) pendant 24 h (A) ou 6 h (B) dans un milieu ne contenant pas d'As(III). En (A), les niveaux d'IL-12p40, d'IL-12p70, d'IL-23 et d'IL-6 présents dans les milieux de culture des DCs activées ont été mesurés par ELISA. En (B), les ARNm totaux ont été isolés, et les niveaux d'ARNm ont été mesurés par RT-qPCR. Les données sont exprimées par-rapport aux niveaux d'ARNm détectés dans les DCs Ctr arbitrairement fixé à 1. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD de 9 (A) et 5 (B) expériences indépendantes. * p <0.05 versus Ct.

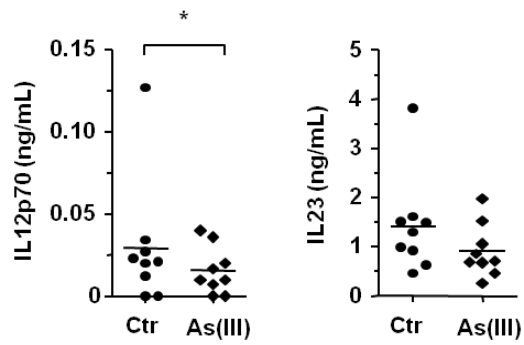


Figure 31: As(III) inhibe la sécrétion d'IL-12p70 des DCs stimulées avec le cocktail de cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 β et TNF- α .

Les monocytes ont été différenciés en iDCs pendant 6 jours en absence ou en présence de 0,25 μ M d'As(III). Ensuite les iDCs ont été lavées et stimulées avec de l'IL-6 (20 ng/mL), du TNF- α (20 ng/mL) et de l'IL-1 β (10 ng/mL) pendant 24 h dans un milieu de culture sans As(III). Les niveaux d'IL-12p70 et d'IL-23 sécrétés dans les milieux de culture ont été déterminés par ELISA. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD de 8 expériences indépendantes.

*p<0.05 versus Ctrl.

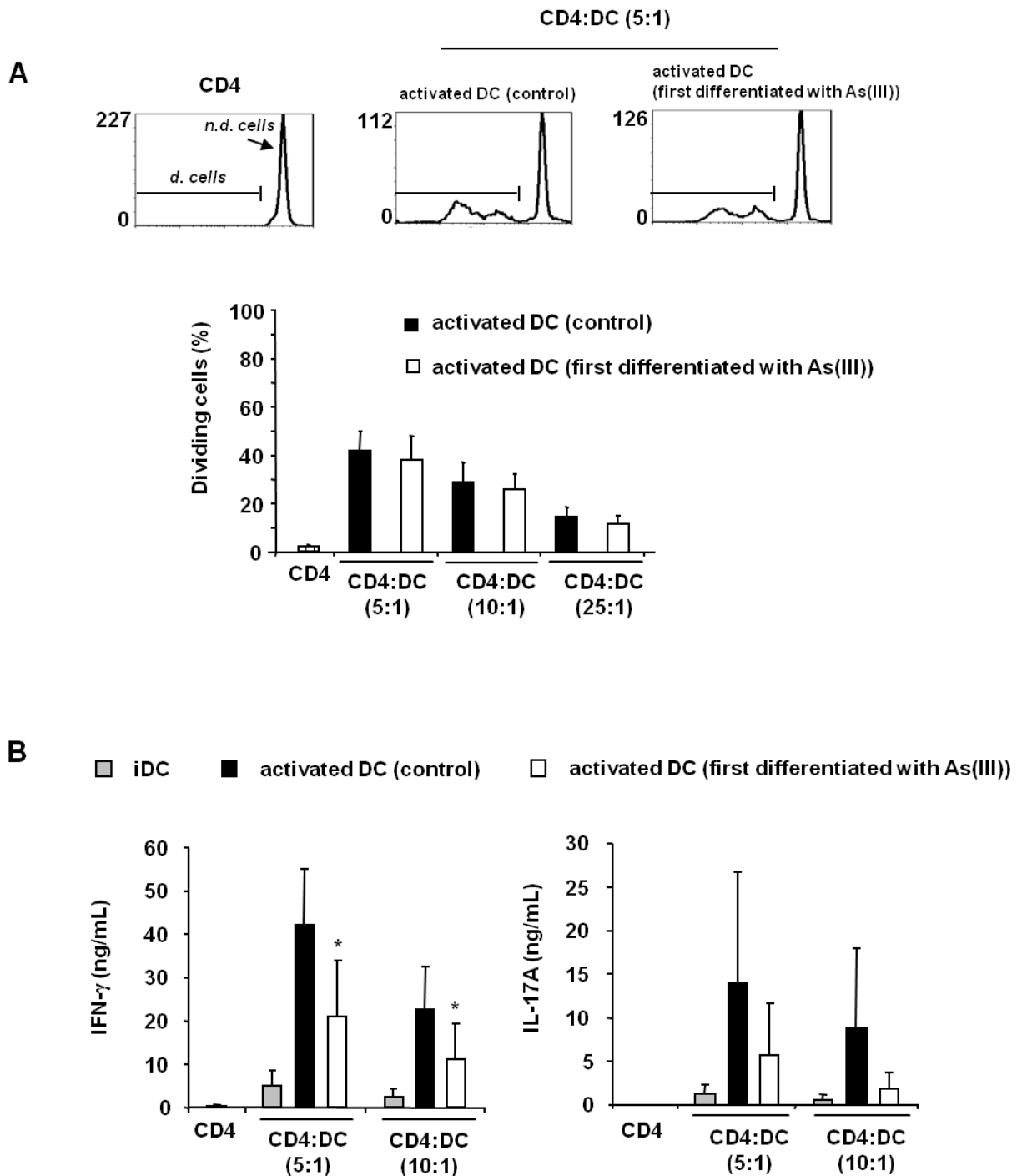


Figure 32: Impact de la différenciation des iDC en présence d'As(III) sur la capacité des mDCs à stimuler les LTs CD4⁺ humains.

Les monocytes ont été différenciés en iDCs pendant 6 jours, en absence ou en présence de 0,25 μ M d'As(III). Puis, les iDCs ont été lavées et stimulées, ou non, avec du LPS (25 ng/mL) pendant 48 h dans un milieu ne contenant pas d'As(III). Des iDCs et des concentrations croissantes de DCs activées ont ensuite été cultivées avec des LTs CD4⁺ humains pendant 5 jours. En (A), la prolifération des LTs a été déterminée par cytométrie en flux en utilisant la sonde CFSE. En (B), les LTs CD4⁺ ont été lavés et restimulés avec du PMA (20 ng/mL) et de l'ionomycine (1 μ M) pendant 24 h. Les niveaux d'IFN- γ et d'IL-17 sécrétés dans les milieux de culture ont été mesurés par ELISA. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD de 5 (A et B) expériences indépendantes. * p <0.05 versus DCs activées (Ctr).

n.d.: non dividing cells, *d*: dividing cells

PARTIE II : IMPACT DIRECT DE L'ARSENIC INORGANIQUE SUR LA MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES

Dans cette seconde partie des Résultats, nous avons étudié les effets directs de concentrations croissantes d'As(III), comprises entre 0,1 μ M et 2 μ M, sur la maturation *in vitro* des iDCs. Pour cela, des iDCs, différenciées en absence de métalloïde, ont été traitées pendant 2 h avec As(III) puis stimulées avec du LPS (25 ng/mL) \pm IFN- γ (50 ng/mL), pendant différents temps d'exposition.

II.1 EFFETS D'As(III) SUR LA VIABILITE DES MDCs ET SUR L'EXPRESSION MEMBRANAIRE DES MARQUEURS DE MATURATION

Dans un premier temps, nous avons déterminé les effets cytotoxiques d'As(III) en quantifiant la viabilité des mDCs exposées pendant 24 h à As(III). La cytotoxicité d'As(III) a été étudiée par cytométrie en flux en utilisant le marquage au PI. La Figure 33A montre que les concentrations de 0,1 à 2 μ M d'As(III) n'ont pas d'effet significatif ni sur l'intensité du marquage PI ni sur le pourcentage de cellules marquées. 85 à 90 % des DCs non traitées, ou exposées à As(III), restent viables après 24 h de culture. Nous avons ensuite évalué les effets d'As(III) sur l'expression membranaire de différents marqueurs caractérisant les mDCs. Nos résultats indiquent qu'As(III) ne modifie pas la répression du marqueur CD1a induite par le LPS après 24 h de stimulation (Figure 33B). De même, As(III) n'altère ni l'augmentation de l'expression membranaire des molécules de costimulation CD80 et CD86, ni celle du marqueur de maturation CD83 dans les mDCs (Figure 33C).

II.2 As(III) INHIBE L'EXPRESSION DE L'IL-12p70 DANS LES MDCs

Ayant démontré dans la première partie de nos résultats que la différenciation des DCs en présence d'As(III) réprime secondairement la capacité des mDCs à produire de l'IL-12p70, nous avons ensuite déterminé si ce métalloïde pouvait inhiber directement l'expression de l'IL-12p70 lors de la maturation des iDCs. La Figure 34A démontre qu'As(III) inhibe, de façon dose-dépendante, les sécrétions d'IL-12p40 et d'IL-12p70 de DCs activées par le LPS. Les concentrations minimales d'As(III) réprimant significativement les sécrétions d'IL-12p40 et d'IL-12p70 sont respectivement de 0,25 μ M et de 0,5 μ M. A la concentration de 2 μ M, As(III) inhibe d'environ 78 % la sécrétion des deux cytokines. As(III) prévient également en partie la sécrétion d'IL-12p70 et d'IL-12p40 de DCs costimulées avec le LPS et l'IFN- γ . Cependant, les effets inhibiteurs du métalloïde sont moins puissants. De plus, nos résultats démontrent qu'As(III) à 2 μ M réduit fortement l'augmentation des niveaux d'ARNm IL12A et IL12B induite par le LPS associé ou non à l'IFN- γ (Figure 34B et 34C).

En revanche, As(III) multiplie par 2,5 fois les niveaux d'ARNm IL8 dans les DCs activés par le LPS. Cet effet du métalloïde est également moins intense dans les DCs costimulés (Figure 34C).

II.3 IMPACT D'As(III) SUR LES PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR LE LPS.

Afin de préciser les mécanismes moléculaires contrôlant les effets inhibiteurs d'As(III) sur l'expression des gènes IL12A et IL12B, nous avons étudié l'impact du métalloïde sur les principales voies de signalisation activées par le LPS lors de sa liaison au TLR4. L'induction de l'expression de l'IL-12 par le LPS implique notamment les MAP-Kinases et l'activation de trois facteurs de transcription majeurs : NF- κ B p65, IRF3 et Sp1 (Takeuchi et Akira, 2010). La Figure 35A indique que le LPS stimule, très rapidement et transitoirement, la phosphorylation des MAP-Kinases JNK et ERK, et plus tardivement celle de p38-kinase. Le pré-traitement des DCs avec 2 μ M d'As(III) ne modifie pas l'activation de JNK et de p38-kinase mais il réduit la phosphorylation de ERK au temps 15 min. Cependant, cette inhibition partielle de la phosphorylation d'ERK n'a pas été systématiquement retrouvée dans les 4 cultures de DCs que nous avons utilisées.

Nous avons ensuite étudié les effets d'As(III) sur l'activation de la voie NF- κ B et sur la liaison de la sous-unité p65 sur ses éléments de réponse κ B. La Figure 35B montre que le LPS induit très rapidement la phosphorylation de la protéine I κ B α , ce qui normalement entraîne sa dégradation par la voie du protéasome. En parallèle, nos résultats indiquent en effet une chute très rapide des niveaux totaux d'I κ B α . A la concentration de 2 μ M, As(III) ne modifie pas cette cinétique de phosphorylation et de dégradation de la protéine I κ B α . En interagissant avec la sous-unité NF- κ B p65 dans le cytoplasme, I κ B α prévient l'activation de la voie NF- κ B. La dégradation d'I κ B α libère la sous-unité p65 qui peut alors migrer vers le noyau. La Figure 35C montre clairement que l'activation des DCs avec le LPS stimule la translocation nucléaire de la sous-unité p65 et sa liaison à l'ADN. Le pré-traitement des DCs avec 2 μ M d'As(III) ne prévient ni la translocation nucléaire de p65 ni sa liaison aux éléments de réponse κ B (Figure 35C). La stimulation du TLR4 par le LPS (2 h) peut également activer le facteur de transcription IRF3 par les voies dépendantes de la protéine adaptatrice TRIF, notamment via les kinases TBK1 et IKK ϵ , homologues de I κ B α (Takeuchi et Akira, 2010). Ce facteur de transcription, surtout connu pour réguler l'expression des IFNs de type 1 comme l'IFN- β , régule également la transcription du gène IL12A (Kastelein et al., 2007). La Figure 35D montre que la stimulation par le LPS augmente l'expression totale d'IRF3 dans la fraction nucléaire des DCs ainsi que sa liaison à l'ADN. As(III) ne modifie pas l'expression nucléaire d'IRF3 et ne prévient pas la fixation du facteur de transcription à ses éléments de réponse. Enfin, nous avons également étudié l'impact d'As(III) sur la liaison à l'ADN du facteur de transcription Sp1 qui est nécessaire à l'activité transcriptionnelle basale et induite du gène IL12A dans les DCs humaines (Goriely et al., 2003). Sp1 est par ailleurs sensible aux variations du statut rédox, notamment à celles causées par As(III) (Chou

et al., 2001). Le métalloïde ne modifie pas l'activité de liaison à l'ADN de Sp1 dans les DCs stimulées par le LPS (Figure 35E).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc qu'As(III) ne réprime pas l'expression des gènes IL12A et IL12B en modulant les voies de signalisation induites par le LPS dans les DCs.

II.4 L'ARSENIC AUGMENTE L'EXPRESSION DES GENES DE REPONSE AU STRESS ET DE LA PROTEINE Nrf2

Afin de poursuivre l'identification des mécanismes moléculaires contrôlant les effets inhibiteurs de l'As(III), nous avons déterminé si les propriétés pro-oxydantes du métalloïde pouvaient contribuer à la répression de l'expression de l'IL-12p70. La Figure 36A montre que ni As(III), ni le tBHQ, un autre composé pro-oxydant modulant l'expression de cytokines dans les LTs de souris, module les niveaux d'EAO dans les DCs stimulées ou non par le LPS. En revanche, As(III) et le tBHQ augmentent les niveaux d'ARNm des gènes de réponse au stress NQO1 et GCLM dans les DCs stimulées ou non par le LPS (Figure 36B et 36C). Le gène GCLM code la protéine γ -glutamylcystéinesynthase qui contrôle la production du glutathion. De plus, As(III) augmente fortement les niveaux d'ARNm HMOX1 qui codent la protéine antioxydante hème-oxygénase 1 (HO-1). Contrairement au métalloïde, le tBHQ ne module pas l'expression de HMOX1 dans les mDCs (Figure 36C). Le gène NQO1, et dans une moindre mesure les gènes GCLM et HMOX1, sont classiquement régulés par le facteur de transcription Nrf2 dont l'activité peut-être induite par As(III) et le tBHQ dans de nombreux modèles cellulaires. Nous avons donc recherché si As(III) et le tBHQ pouvaient augmenter l'expression de cette protéine dans les mDCs. Nrf2 présente un poids moléculaire de 57 kDa, cependant cette protéine n'est généralement détectée en Western blot que sous sa forme polyubiquitinée et/ou phosphorylée aux environs de 100 kDa (Lau et al., 2013b). Afin de disposer d'un contrôle positif nous permettant de confirmer l'expression de Nrf2 au poids moléculaire attendu en Western blot, nous avons utilisé le MG132, un inhibiteur du protéasome, qui bloque la dégradation de Nrf2. Comme espéré, dans les lysats totaux de DCs traitées pendant 2 h avec le MG132, l'expression de Nrf2 est bien détectée au niveau d'une bande située entre 90 et 110 kDa (Figure 36D). Nos résultats démontrent clairement qu'As(III) et le tBHQ augmentent l'expression de Nrf2, notamment dans les lysats totaux de DCs stimulés par le LPS. De plus, la Figure 36E indique que l'expression de Nrf2 est essentiellement détectée dans les fractions nucléaires de DCs exposées à ces composés.

II.5 LE tBHQ PREVIENT EGALEMENT L'AUGMENTATION DES NIVEAUX D'ARNM IL12A ET IL12B DANS LES MDCs

Afin de déterminer si la protéine Nrf2 peut être impliquée dans la répression de l'expression des gènes IL12A et/ou IL12B, nous avons étudié, dans un premier temps, l'effet du tBHQ sur les niveaux d'ARNm de ces deux gènes. Comme cela a été observé avec As(III), le tBHQ réprime fortement l'induction des niveaux d'ARNm IL12A et IL12B dans les DCs stimulées par le LPS seul ou associé à l'IFN- γ (Figure 37A). De plus, le tBHQ augmente également significativement l'expression du gène *IL8* (Figure 37A) mais n'a aucun effet sur l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription NF- κ B p65, IRF3 et Sp1 (Figure 37B). Ce composé ne modifie pas, non plus, l'activation des MAP-Kinases induite par le LPS dans les DCs (résultats non montrés).

II.6 L'EXTINCTION DE LA PROTEINE Nrf2 PREVIENT L'INDUCTION DE L'EXPRESSION DU GENE NQO1 PAR L'As(III)

Dans un second temps, nous avons transfecté des siRNANrf2 et des siRNACtr dans les DCs, avec le réactif lipofectamine RNAiMAX, afin de déterminer l'impact de l'extinction de la protéine Nrf2 sur l'induction du gène NQO1 dans les DCs exposées à As(III). La Figure 17 montre que la transfection des siRNA Nrf2 réprime de 40 % les niveaux d'ARNm Nrf2 dans les DCs non activées (A) et d'environ 50 % l'expression de la protéine Nrf2 dans les DCs pré-traitées par As(III) puis stimulées ou non par le LPS (B). L'extinction de Nrf2 réduit les niveaux d'ARNm NQO1 dans les DCs stimulées ou non par le LPS et, surtout, prévient en grande partie l'induction des niveaux d'ARNm NQO1 dans les DCs traitées par l'As(III) (Figure 38C).

II.7 L'EXTINCTION DE LA PROTEINE Nrf2 PREVIENT EN GRANDE PARTIE LA REPRESSION DES GENES IL12A ET IL12B INDUITE PAR AS(III) ET LE tBHQ DANS LES MDCs

Enfin, nous avons étudié l'impact de l'extinction de la protéine Nrf2 sur les effets d'As(III) et du tBHQ vis à vis des gènes IL12A, IL12B, IL6 et IL8 dans les DCs stimulées par le LPS. Il est tout d'abord intéressant de constater que l'extinction de la protéine Nrf2 augmente de 62 % les niveaux d'ARNm IL12A dans les DCs stimulées par le LPS (Figure 39). De plus, la Figure 39 démontre que la transfection des siRNA Nrf2 prévient pratiquement totalement la chute des niveaux d'ARNm IL12A et IL12B induite par As(III) dans les DCs activées. En revanche, l'extinction de la protéine Nrf2 n'a aucun effet sur les niveaux d'ARNm IL6 et elle ne prévient pas l'augmentation des niveaux d'ARNm IL8 induit par As(III). Concernant le tBHQ, la transfection des SiNFR2 prévient, également en grande partie, les effets répresseurs de ce composé sur les niveaux d'ARNm IL12A et

IL12B. Cependant, comme pour As(III), elle ne bloque pas l'augmentation de l'expression du gène IL8 dans les DCs stimulées avec le LPS.

Au cours de cette seconde partie, nos résultats ont principalement démontré i) que le pré-traitement des iDCs avec As(III) ou le tBHQ bloque très fortement l'expression des gènes IL12A et IL12B lors de leur maturation avec le LPS, et ii) que le facteur de transcription Nrf2 joue très probablement un rôle clé dans les effets répresseurs de ces deux composés.

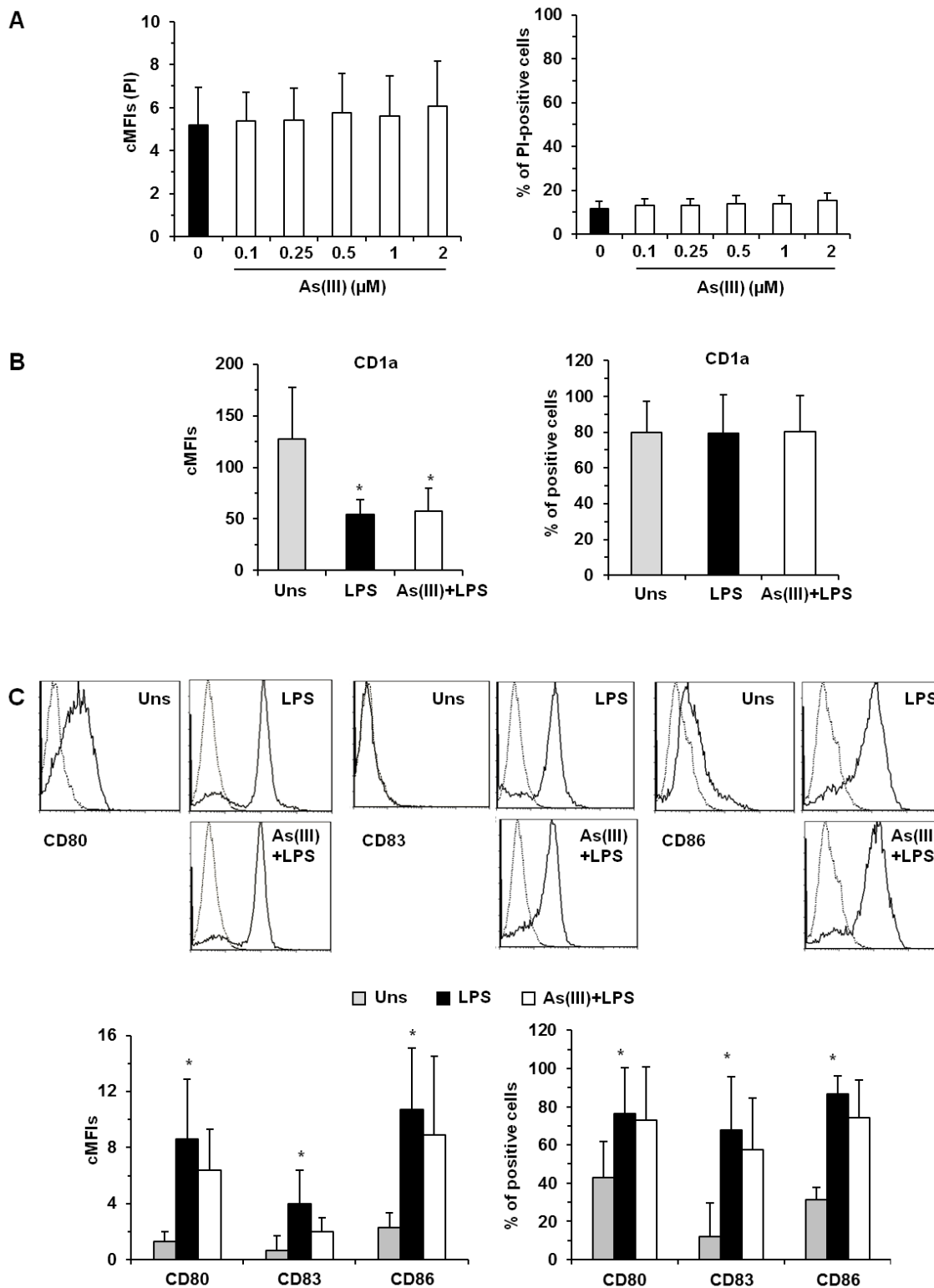


Figure 33: Impact d'As(III) sur la viabilité et sur l'expression membranaire des marqueurs de maturation des DCs.

Les iDCs ont été incubées pendant 2 h en absence ou en présence de concentrations croissantes (A) ou de 2 μM (B, C) d'As(III), puis stimulées, ou non (Uns), pendant 24 h avec du LPS (25 ng/mL). En (A), la viabilité cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux en déterminant le marquage à l'iodure de propidium (PI). L'expression membranaire des marqueurs CD1a (B), CD80, CD83 et CD86 (C) a également été déterminée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SD de 8 (A) et 6 (B et C) expérience indépendante. *p<0.05, versus Uns.

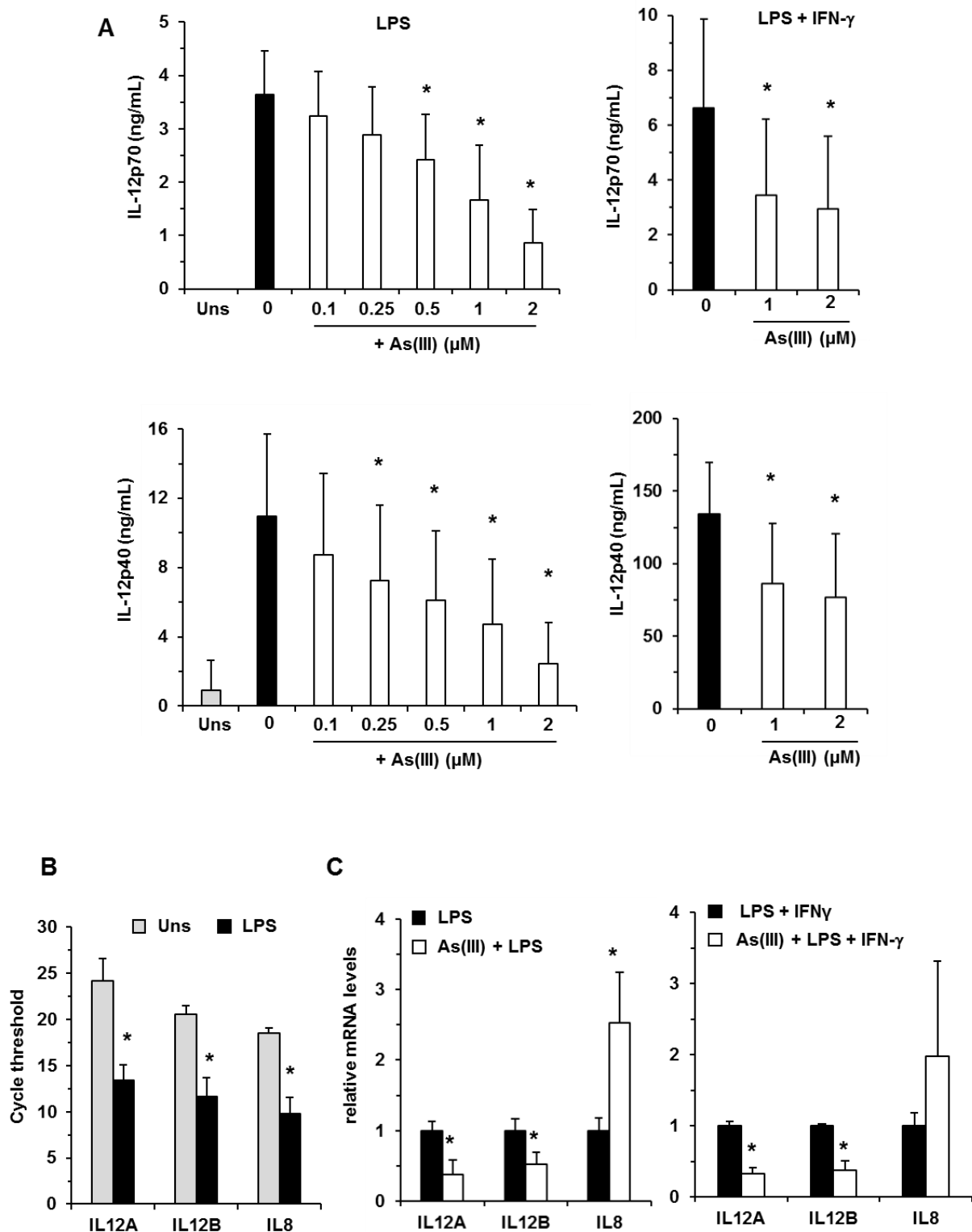


Figure 34: As(III) inhibe l'expression d'IL-12p40 et d'IL-12p70 dans les mDCs.

Les iDCs ont été incubées pendant 2 h en présence ou en absence de concentrations croissantes (A) ou de 2 μM (C) d'As(III) puis stimulées avec du LPS (25 ng/mL), ou du LPS + IFN-γ (50 ng/mL), pendant 24 h (A) ou 6 h (B, C). En (A), les niveaux d'IL-12p40 et d'IL-12p70 sécrétés dans le milieu de culture ont été quantifiés par ELISA. En (B, C), les niveaux d'ARNm ont été quantifiés par RT-qPCR. En (C), les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm des DCs stimulées par le LPS arbitrairement fixés à 1. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 6 (LPS) et 4 (LPS + IFN-γ) expériences indépendantes en (A), et 9 (IL12A, IL12B) et 4 (IL8) expériences indépendantes en (B, C). *p<0.05 versus 0 (A), Uns (B) et LPS ou LPS + IFN-γ (C).

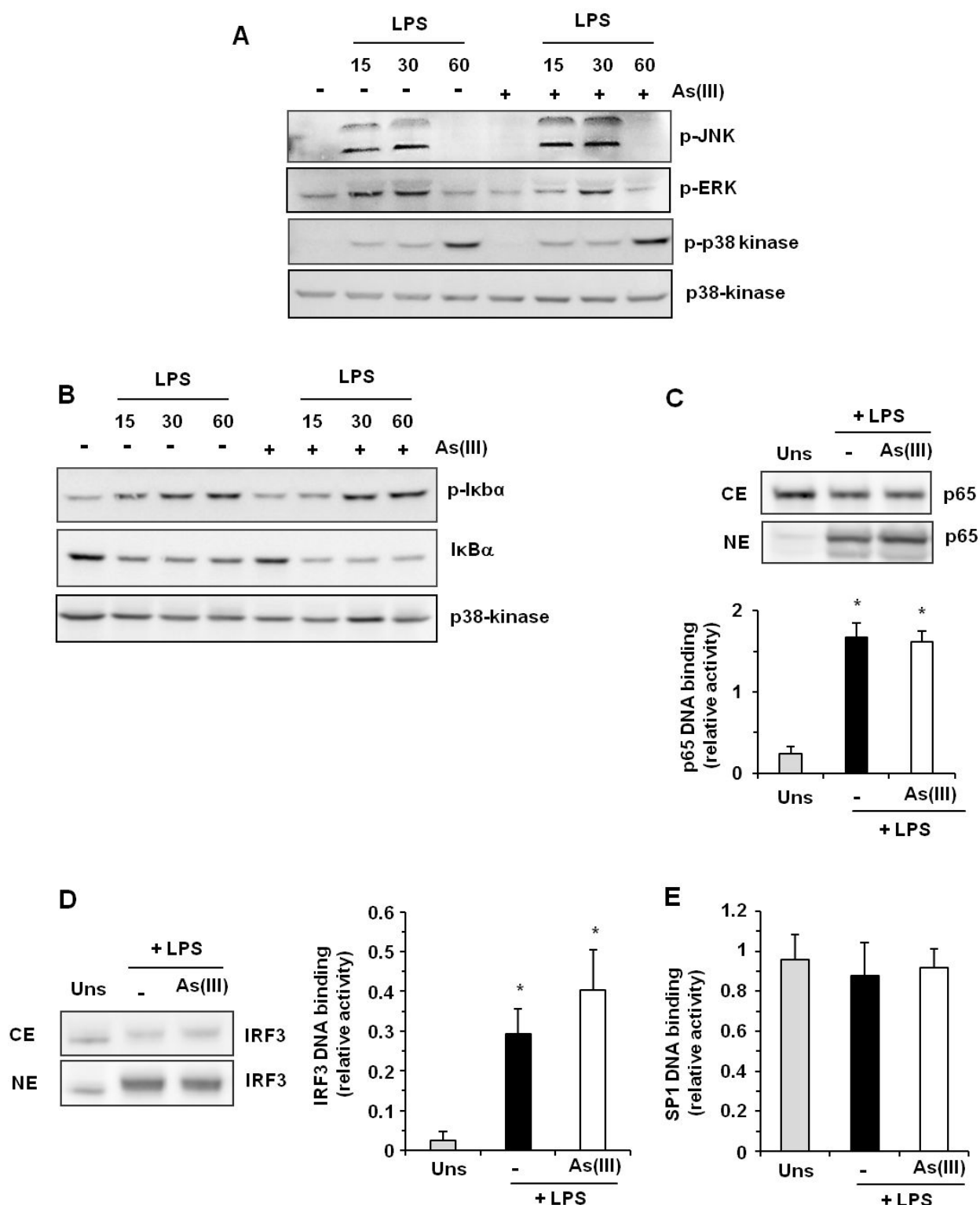
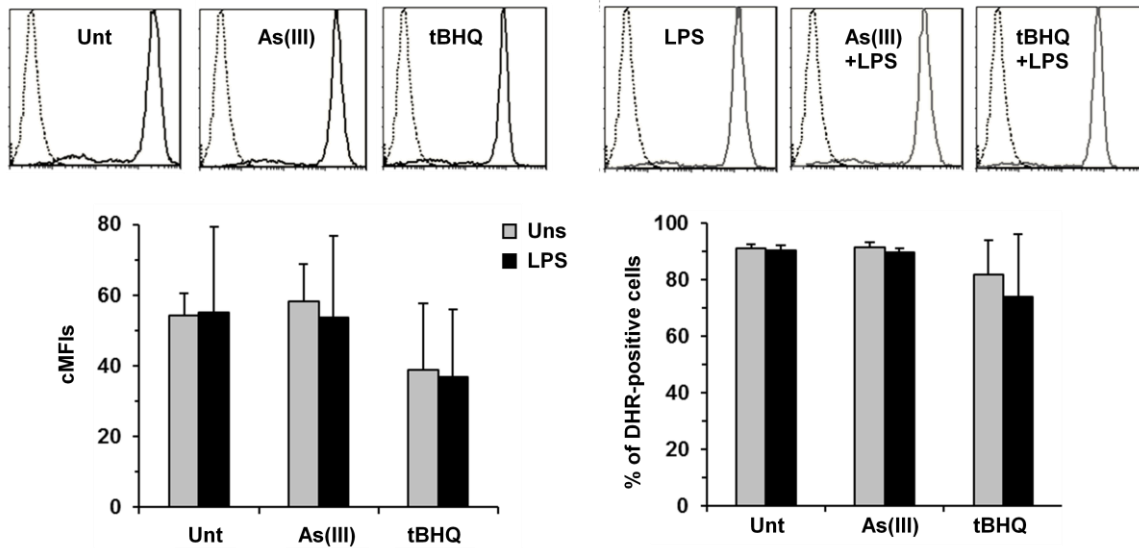


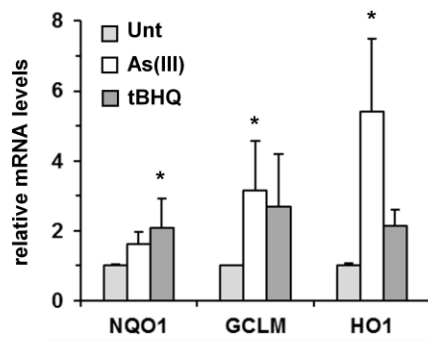
Figure 35: Impact d'As(III) sur les principales voies de signalisation activées par le LPS.

Les iDCs ont été incubées pendant 2 h en présence ou en absence de 2 μ M As(III) puis stimulées, ou non (Uns), avec du LPS (25 ng.mL⁻¹) pendant les temps indiqués (A, B) ou pendant 1 h (C, D, E). En (A-D), les niveaux d'expression des protéines totales ou phosphorylées dans des lysats cellulaires totaux (A, B) ou dans les fractions cytosoliques (CE) et nucléaires (NE) (C, D) ont été déterminés par Western-Blot. En (C-E), la liaison des facteurs de transcription p65 (C), IRF3 (D) et Sp1(E) à leurs éléments de réponse dans les fractions nucléaires a été quantifiée par ELISA en utilisant le kit TransAM (Active Motif). En (C-E), les données sont exprimées sous la forme de moyennes \pm SD de 4 expériences indépendantes.*p<0.05 versus Uns.

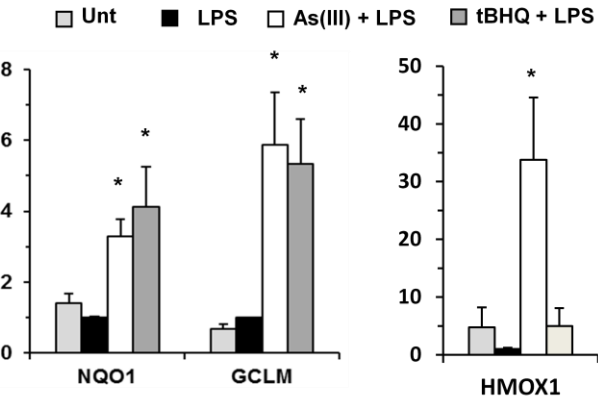
A



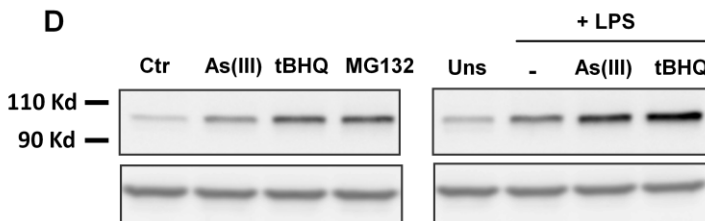
B



C



D



E

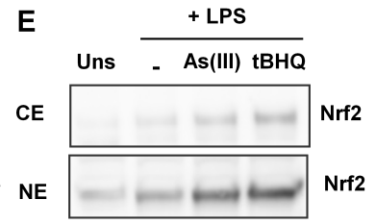


Figure 36 : As(III) et tBHQ stimulent l'expression des gènes de réponse au stress et de la protéine Nrf2 dans les DCs.

Les iDCs ont été incubées pendant 2 h en absence (Unt) ou en présence d'As(III) (2 μ M), de tBHQ (10 μ M) ou de MG132 (50 μ M), puis stimulées, ou non (Uns) par du LPS (25 ng/mL) pendant 1 h (A, E) ou 6 h (B-D). En (A), la production d'EOs a été déterminée par cytométrie en flux en utilisant la sonde dihydrorhodamine 123. La courbe en pointillée sur les graphes correspond aux valeurs d'auto fluorescence. En (B, C), les niveaux d'ARNm ont été déterminés par RT-qPCR. Les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm des DCs Unt (B) ou des DCs Uns (C) arbitrairement fixés à 1. En (D et E), les niveaux protéiques de Nrf2 ont été déterminés par Western-Blot dans des lysats totaux (D) ou dans des fractions cytosoliques (CE) et nucléaires (NE) (E). En (A-C), les données ont été exprimées sous la forme de moyennes \pm SD de 4 expériences indépendantes. *p<0.05, versus DCs Unt (B) ou DCs Uns (C).

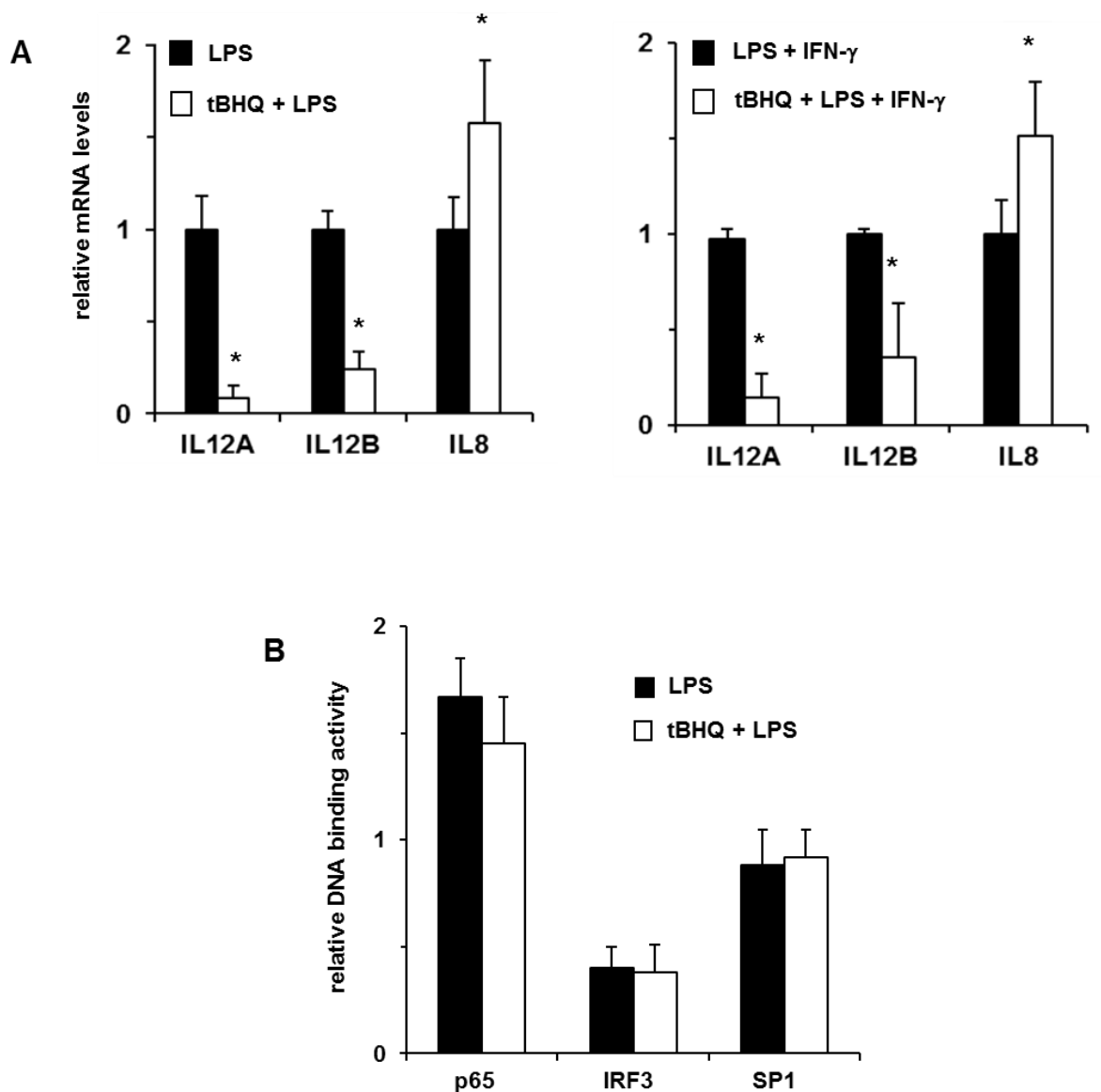


Figure 37 : Le tBHQ inhibe l'expression des gènes IL12A et IL12B dans les mDCs.

Les iDCs ont été incubées en absence ou en présence de tBHQ (10 μ M) pendant 2 h puis stimulées avec du LPS (25 ng/mL) ou du LPS + IFN- γ (50 ng/mL) pendant 6 h (A) ou 1 h (B). En (A), les niveaux d'ARNm ont été déterminés par RT-qPCR. Les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm des DCs stimulées arbitrairement fixés à 1. En (B), la liaison des facteurs de transcription p65, IRF3 et Sp1 à leurs éléments de réponse dans les fractions nucléaires a été quantifiée par ELISA en utilisant les kits TransAM (Active Motif). Les données sont exprimées sous la forme de moyennes \pm SD de 4 expériences indépendantes. * $p < 0.05$ versus LPS ou LPS + IFN- γ .

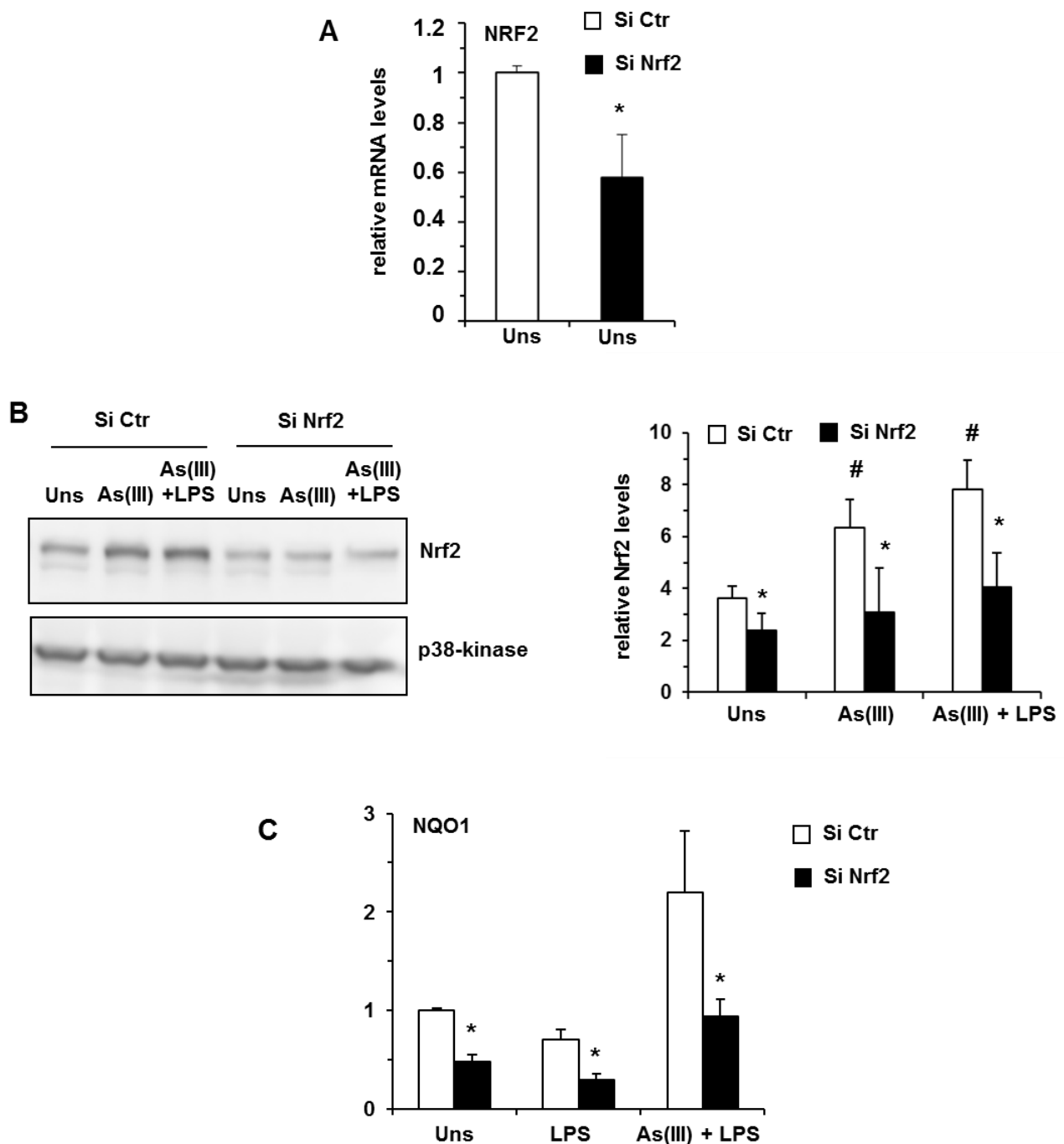


Figure 38: L'extinction de la protéine Nrf2 réduit l'expression du gène NQO1 dans les DCs.

Les iDCs ont été transfectées à J5 avec des siRNA Nrf2 ou des siRNA Ctr pendant 18 h. Puis, après lavage, les iDCs ont été incubées pendant 2 h en absence ou en présence d'As(III) (2 μ M) puis stimulées, ou non (Uns), avec du LPS (25 ng/mL) pendant 6 h. En (A, C), les niveaux d'ARNm ont été déterminés par RT-qPCR. Les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm des DCs transfectées avec les siCTR (Uns) arbitrairement fixés à 1. En (B), les niveaux d'expression de la protéine Nrf2 ont été déterminés par Western-Blot dans les lysats cellulaires totaux. L'intensité du signal a été quantifiée par densitométrie et normalisée par rapport à l'intensité du signal de la protéine p38-kinase totale, en utilisant le logiciel Multi-Gauge (graphique de droite). Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes \pm SD de 4 expériences indépendantes. * $p < 0.05$ versus DCs SiCtr, # $p < 0.05$ versus DCs Uns (siRNA Ctr) (B).

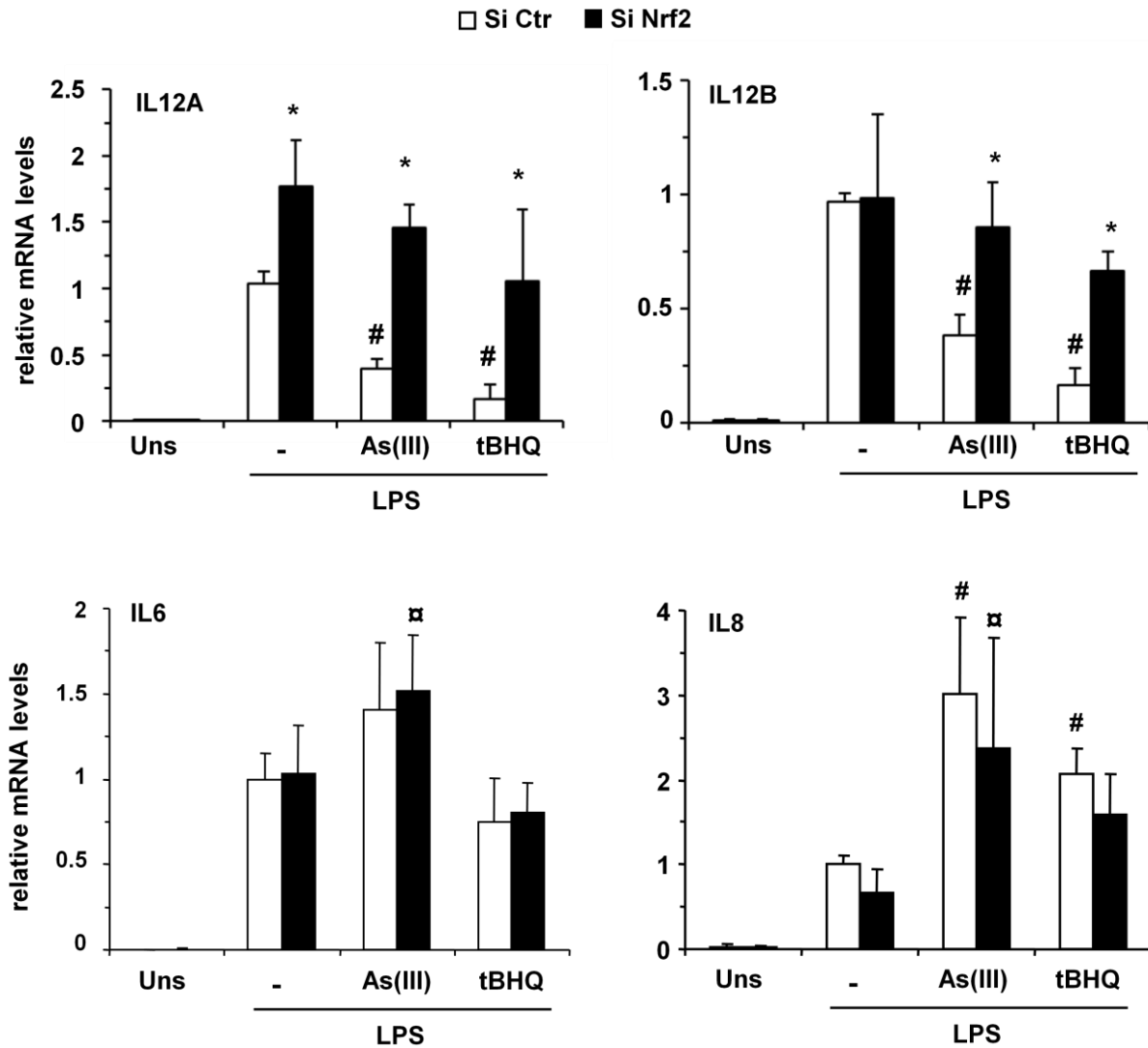


Figure 39 .L'extinction de la protéine Nrf2 prévient la répression des gènes IL12A et IL12B induite par As(III) et le tBHQ dans les DCs activées.

Les iDCs ont été transfectées à J5 avec des siRNA Nrf2 ou des siRNA Ctr pendant 18 h. Puis, après lavage, les iDCs ont été incubées pendant 2 h en absence (Unt) ou en présence d'As(III) (2 μ M) ou de tBHQ (10 μ M), puis stimulées, ou non (Uns), avec du LPS (25 ng/mL) pendant 6 h. Les niveaux d'ARNm pour les gènes d'intérêt ont été déterminés par RT-qPCR. Les données sont exprimées par-rapport aux niveaux d'ARNm des DCs Unt (siRNA Ctr) arbitrairement fixés à 1. * $p < 0.05$ versus si Ctr, # $p < 0.05$ versus DC Unt (Si Ctr), α $p < 0.05$ versus DC Unt (siRNA Nrf2).

Discussion

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié l'impact de l'arsenic inorganique, un contaminant environnemental majeur, sur la physiologie *in vitro* des DCs humaines en culture primaire. Ces cellules jouent un rôle clé dans l'immunité en étant à la fois initiateur et promoteur de la réponse immunitaire adaptative. A ce titre, les DCs sont fortement impliquées dans les défenses de l'organisme, en prévenant le développement des infections et celui de certains cancers. De plus, l'activité non contrôlée des DCs peut contribuer à l'apparition de maladies inflammatoires chroniques, d'origine immunitaire. L'arsenic inorganique favorise le développement de pathologies humaines associées à un dysfonctionnement du système immunitaire. Bien que ce métalloïde soit aujourd'hui reconnu comme un véritable agent immunotoxique, ses effets sur la différenciation et la maturation des DCs étaient inconnus au démarrage de ces travaux.

Pour réaliser nos différentes expériences, nous avons utilisé l'arsénite de sodium, une forme inorganique trivalente soluble dans l'eau. En milieu aqueux, ce dérivé arsénié se transforme en $\text{As}(\text{OH})_3$ qui est la principale espèce chimique à laquelle les individus sont exposés lorsqu'ils ingèrent de l'eau contaminée (Liu et al., 2004). $\text{As}(\text{OH})_3$ correspond également à la forme trivalente circulant dans le plasma des individus exposés, et interagissant avec les cibles cellulaires du métalloïde. Selon les expériences réalisées, nous avons utilisés des concentrations d'arsénite de sodium allant de 0,1 à 2 μM . Cette gamme de concentration correspond aux taux plasmatiques d'arsenic mesurés chez les individus souffrant d'APL et traités par le Trisenox. Les concentrations les plus faibles (0,1 à 0,5 μM) se situent également dans la fourchette des taux plasmatiques d'arsenic élémentaire détectés chez les individus exposés chroniquement par voie environnementale (soit 10 à 40 $\mu\text{g/L}$) (Pi et al., 2000; Wu et al., 2003). L'ensemble de nos résultats démontre que l'arsenic inorganique altère significativement la physiologie *in vitro* des DCs humaines. Ses effets dépendent fortement de la concentration de métalloïde utilisée et certains effets sont observés dès la dose de 0,1 μM .

Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de l'arsenic sur la différenciation des DCs générées à partir de monocytes de sang périphérique collecté chez des donneurs sains. Les monocytes ont été différenciés, en présence de GM-CSF et d'IL-4, dans un milieu de culture contenant ou non le métalloïde. Nos données montrent clairement que des concentrations d'arsenic $\geq 1 \mu\text{M}$ bloquent la différenciation *in vitro* des DCs en induisant des effets cytotoxiques. L'arsenic pourrait favoriser la mort des monocytes en inhibant spécifiquement les voies de survie induites par le GM-CSF au cours de ce processus de différenciation. Il est bien connu que le GM-CSF joue un rôle majeur dans la survie, *in vitro*, des monocytes en cours de différenciation (Conti et Gessani,

2008; Sallusto et Lanzavecchia, 1994). Cependant, au de-là de son rôle dans le modèle de différenciation *in vitro*, il semble aujourd'hui admis que ce facteur de croissance contribue également de manière essentielle à la survie et à la différenciation *in vivo* des DCs, générées physiologiquement ou dans un contexte inflammatoire (Laar et al., 2012). Il est démontré qu'un nombre plus important de DCs est mesuré dans la rate et le thymus de souris traitées par des injections de GM-CSF, ou de souris transgéniques surexprimant le GM-CSF (Daro et al., 2000; Vremec et al., 1997). Inversement, les souris invalidées pour le gène codant le GM-CSF, ou son récepteur, présentent un nombre significativement réduit de DCs dans la peau et les intestins, ce qui suggère un rôle du GM-CSF dans la différenciation des DCs conventionnelles dans un contexte physiologique (Kingston et al., 2009; Varol et al., 2009). Lors de situations inflammatoires, le GM-CSF, dont les taux sanguins augmentent rapidement, stimule plus spécifiquement la différenciation des DCs à partir des monocytes circulant et favorise la production de cellules particulièrement immunogènes (Laar et al., 2012). Les mécanismes moléculaires contrôlant les effets cellulaires du GM-CSF sont très complexes et impliquent de nombreuses voies de signalisation. Parmi celles-ci, l'activation des voies MEK/ERK, PI3K/AKT et NF- κ B jouent un rôle clé dans la survie des DCs. Il est très probable que l'arsenic induise la mort des monocytes en cours de différenciation en bloquant, au moins, l'activation de la voie NF- κ B. Il est démontré que ce métalloïde induit l'apoptose de différents types cellulaires en inhibant l'activité de la sous-unité NF- κ B p65 (Mathieu et Besançon, 2006; Nasr et al., 2003; Mathas et al., 2003) . Mais surtout, notre équipe a déjà démontré que des concentrations d'arsenic inorganique, similaires à celles utilisées dans ce travail de thèse, préviennent la différenciation *in vitro* de monocytes humains en macrophages en inhibant des voies de survie contrôlées par NF- κ B (Lemarie et al., 2006a). Dans le modèle macrophagique, la survie et la différenciation des monocytes est induite par le GM-CSF seul. La viabilité des monocytes est essentielle puisqu'elle permet le développement sur plusieurs jours du programme de différenciation en macrophages. Le GM-CSF contrôle la survie des monocytes en activant très précocement NF- κ B et ses gènes cibles, notamment ceux codant les protéines anti-apoptotiques XIAP et cFLIP. L'arsenic bloque cette augmentation de l'activité NF- κ B dans les monocytes exposés au GM-CSF et prévient l'expression des protéines de survie XIAP et cFLIP (Lemarie et al., 2006a). En dehors de la voie NF- κ B, il est également possible que l'arsenic interfère avec les voies MEK/ERK ou PI3K/AKT dans les monocytes en cours de différenciation. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la viabilité des iDCs, non exposées au métalloïde durant leur différenciation, n'est pas altérée lorsqu'elles sont ensuite traitées avec des doses de 1 ou 2 μ M d'arsénite de sodium pendant 24 h. Contrairement aux monocytes, les iDCs présentent très certainement des mécanismes de survie et de défense exprimés à des niveaux suffisants pour bloquer les effets cytotoxiques du métalloïde.

Deuxièmement, nos résultats démontrent que la différenciation des monocytes en présence de concentrations non cytotoxiques d'arsenic (0,1 - 0,5 μ M) réprime très fortement la sécrétion d'IL-12p70 et d'IL-23 à partir de DCs stimulées par le LPS. Bien que la sécrétion de ces deux cytokines pro-inflammatoires soit une fonction majeure de DCs différenciées et activées, le métalloïde ne semble pas agir spécifiquement sur le processus de différenciation. En effet, la différenciation des monocytes en présence du métalloïde ne modifie significativement ni l'induction de l'expression membranaire du DC-SIGN ou du CD1a, ni l'activité d'endocytose, qui sont des caractéristiques de DCs pleinement différenciées. De plus, l'arsenic inhibe la sécrétion d'IL-12p70 induite par le LPS lorsque les DCs ne sont exposées au métalloïde qu'après leur processus de différenciation. Le métalloïde interfère donc, plus probablement, avec un ou plusieurs mécanismes moléculaires contrôlant la sécrétion des cytokines. Dans ce cadre, différents arguments démontrent que le métalloïde inhibe un processus assez général qui n'est pas spécifiquement associé aux mécanismes moléculaires activés par le LPS lors de sa liaison au TLR4. En effet, la différenciation des monocytes en présence d'arsenic ne prévient ni l'expression des molécules de costimulation CD80/86 et CD83, ni l'activation des principales voies de signalisation (résultats non montrés dans la thèse), induites par le LPS dans les iDCs. En revanche, ce traitement inhibe non seulement la sécrétion d'IL-12p70 et d'IL-23 à partir de DCs co-stimulées par des ligands du TLR2 (zymosan) ou des TLR7/8 (R848) en présence d'IFN- γ , mais également celles de cellules activées par un cocktail de cytokines mimant un contexte inflammatoire. Le métalloïde ne semble donc pas agir directement avec les TLRs mais plutôt en aval de ces récepteurs.

Afin de déterminer par quel mécanisme moléculaire l'arsenic peut inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, nous avons choisi d'étudier plus précisément l'impact de ce métalloïde sur l'expression de l'IL-12p70 qui est assez bien décrite dans la littérature. L'expression de l'IL-12p70 résulte de la transcription des gènes IL12A et IL12B; cependant, l'étape limitant les concentrations d'IL-12p70 dans les DCs est l'induction du gène IL12A qui code la sous-unité p35 (Langrish et al., 2004). Nos résultats indiquent que l'arsenic réduit très significativement l'augmentation des niveaux d'ARNm des gènes IL12A et IL12B dans les DCs activées par le LPS, lorsqu'il est ajouté pendant le processus de différenciation ou juste avant la maturation des iDCs. Ces diminutions des niveaux d'ARNm, et notamment celles du gène IL12A, sont également observées lorsque les DCs, différenciées en présence d'arsenic, sont ensuite co-stimulées par le zymosan et l'INF- γ . Dans le modèle de DCs inflammatoires dérivées de monocytes, le métalloïde inhibe donc très certainement la sécrétion de l'IL-12p70 en réprimant l'induction du gène IL12A lors de la maturation des iDCs. Les MAP-kinases et les facteurs de transcription NF- κ B, IRF3 et Sp1 jouent un rôle essentiel dans la régulation de la transcription du gène IL12A (Goriely et al., 2003, 2006; Lu et

al., 1999). Nos résultats montrent cependant que l'arsenic n'altère ni l'activation des MAP-Kinases ni celles de ces trois facteurs de transcription lorsque les DCs sont activées par le LPS. L'activité des MAP-Kinases ERK, JNK et p38-kinase a été déterminée indirectement en mesurant leurs niveaux de phosphorylation. Le métalloïde ne prévient pas l'augmentation des niveaux de phosphorylation des trois MAP-Kinases induites par le LPS. De même, le métalloïde n'a aucun effet sur l'activation de la voie NF- κ B dans les iDCs stimulées. En effet, le métalloïde i) ne réduit ni le niveau de phosphorylation, ni la dégradation, de la protéine inhibitrice I κ B α , ii) ne bloque pas la translocation nucléaire de la sous-unité p65 et iii) ne modifie pas l'activité de liaison à l'ADN de la sous-unité p65 induite dans les DCs activées. Ces résultats confirment l'absence de l'impact des faibles doses d'arsenic sur l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules humaines d'origine monocyttaire exposées, ou non, au LPS (Bourdonnay et al., 2009, 2011). Le métalloïde ne modifie pas non plus la translocation nucléaire du facteur de transcription IRF3 et il ne bloque pas son activité de liaison à l'ADN dans les DCs activées. Il est intéressant de noter toutefois que des doses comparables d'arsenic préviennent l'expression du gène codant la NO synthase inductible (iNOS), dans la lignée macrophagique RAW 264.7 stimulée par le LPS, en inhibant l'activation du facteur de transcription IRF3 (Takahashi et al., 2013). Ce facteur de transcription, dont l'activation est contrôlée par la protéine adaptatrice TRIF, peut donc constituer une cible moléculaire du métalloïde dans les cellules immunitaires. Le facteur de transcription Sp1 joue un rôle essentiel dans l'expression basale et induite du gène IL12A dans les DCs humaines (Goriely et al., 2003). Contrairement à NF- κ B et IRF3, l'activité de liaison à l'ADN de Sp1 est constitutivement élevée *in vitro* dans les DCs dérivées de monocytes, et celle-ci n'est pas augmentée par le LPS (Goriely et al., 2004). Cependant, *in vivo*, l'endotoxine induit le remodelage d'un nucléosome au sein du promoteur du gène IL12A qui permet l'accessibilité et l'activation d'un élément de réponse Sp1 essentiel pour l'induction de ce gène (Goriely et al., 2004). Nos résultats montrent que l'arsenic ne modifie pas l'activité de liaison à l'ADN de la protéine Sp1 dans les DCs stimulées ou non par le LPS. Pourtant, Sp1 est un facteur de transcription dont l'activité est très sensible au statut rédox de la cellule. Dans la lignée promyélocytaire NB4, un traitement de 9 jours avec 0,75 μ M de trioxyde d'arsenic favorise l'oxydation des groupements thiols de certains résidus cystéines de Sp1 et réduit ainsi l'activité transcriptionnelle de cette protéine (Chou et al., 2001). Ces oxydations résultent de l'augmentation des niveaux d'EAO lorsque les cellules NB4 sont exposées au métalloïde durant de longues périodes. Concernant les DCs, nous n'avons pas observé de variation des niveaux d'EAO dans ces cellules traitées par l'arsenic durant 6 h ; ceci pourrait expliquer l'absence d'effets du métalloïde sur l'activité de liaison à l'ADN de Sp1. Indépendamment de l'activation des MAP-Kinases et de ces facteurs de transcription, l'expression de l'IL-12p70 est également contrôlée par des mécanismes épigénétiques

impliquant des variations des niveaux d'acétylation du promoteur IL12A (Alvarez et al., 2012). Bien qu'il soit connu que l'arsenic puisse inhiber l'activité et l'expression d'histone deacetylases, il est peu probable que ce mécanisme contribue à la répression du gène IL12A, car les effets du métalloïde sur ces enzymes ne sont généralement observés que pour des concentrations largement supérieures à celles utilisées dans nos expériences (Qu et al., 2012; Ramirez et al., 2008). Ces résultats montrent donc que le métalloïde ne réprime pas l'induction des niveaux d'ARN IL12A en bloquant directement l'activation d'une voie de signalisation essentielle à la transcription de ce gène.

Nous avons ensuite déterminé si l'arsenic inorganique peut inhiber indirectement l'expression du gène IL12A en activant un mécanisme répresseur. Dans ce but, nous avons étudié le rôle potentiel du facteur de transcription Nrf2 qui est activé par l'arsenic dans la très grande majorité des modèles cellulaires étudiés (Endo et al., 2008; Wang et al., 2008; Aono et al., 2003). Nrf2 contrôle la réponse cellulaire au stress et maintient le statut redox intracellulaire en induisant l'expression d'un grand nombre de gènes codant des protéines anti-oxydantes. De plus, les résultats de plusieurs études menées sur des souris KO pour le gène NRF2 démontrent que ce facteur de transcription possède également des propriétés immunomodulatrices contribuant le plus souvent à réduire les réponses inflammatoires induites par le LPS, le TNF- α , des allergènes ou certaines substances chimiques (Williams et al., 2008; Thimmulappa et al., 2006; Kikuchi et al., 2005; Rangasamy et al., 2005;). Nos résultats montrent clairement que l'arsenic active le facteur de transcription Nrf2 dans les DCs stimulées ou non par le LPS. Le métalloïde augmente les niveaux d'expression totaux et nucléaires de la protéine Nrf2 et il stimule l'expression de gènes classiquement induits par Nrf2, tels que le gène NQO1. Cette activation de Nrf2 pourrait jouer un rôle clé dans la répression de l'expression de l'IL-12p70 induite par l'arsenic. En effet, d'une part, nos résultats démontrent que le tBHQ, un puissant activateur de Nrf2, i) active également Nrf2 dans les DCs, ii) mime les effets du métalloïde sur l'expression des gènes IL12A et IL12B et iii) n'a aucun effet sur l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription p65, IRF3 et Sp1 dans les DCs activées par le LPS. D'autre part, l'extinction de la protéine Nrf2 par la transfection de siRNA réduit les niveaux d'ARNm NQO1, notamment ceux induits par l'arsenic, et prévient en grande partie les effets répresseurs du tBHQ et du métalloïde sur l'expression des gènes IL12A et IL12B. Nos résultats concordent avec ceux des travaux menés par Chan et coll sur le modèle de souris KO pour le gène Nrf2 (Chan et al., 2006). Ces travaux montrent clairement que les traitements avec des particules diésel, ou du sulforaphane, un autre inducteur puissant de Nrf2, répriment très significativement l'expression de l'IL-12p40 dans des DCs de souris sauvages, mais que ces traitements n'ont aucun effet sur les DCs de souris KO. Afin de confirmer l'implication de Nrf2 dans les effets répresseur de l'arsenic, il serait important de comparer l'impact du métalloïde sur l'expression de l'IL-12p70 dans des DCs issues de souris

sauvages et KO pour le gène Nrf2. Nous réalisons actuellement ces expériences en collaborant avec le Pr. Saadia Kerdine-Romer (Inserm U996, Paris-11) qui possèdent les souris KO Nrf2 et qui maîtrise la technique pour générer des DCs dérivées de précurseurs de moelle osseuse. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'extinction de la protéine Nrf2 dans notre modèle cellulaire augmente significativement les niveaux d'ARNm IL12A dans les DCs stimulées uniquement par le LPS. Cependant, cette extinction ne modifie ni l'expression des gènes IL6 et IL8 induite par le LPS, ni la surinduction du gène IL8 dans les DCs pré-traitées par le tBHQ ou l'arsenic. Collectivement, nos résultats suggèrent donc un rôle immunomodulateur de Nrf2 assez spécifique vis-à-vis de l'expression des gènes IL12A et IL12B dans les DCs humaines.

Nous n'avons pas élucidé les mécanismes moléculaires par lesquels Nrf2 pourrait réguler l'expression des gènes IL12A et IL12B, mais trois hypothèses peuvent être envisagées. Premièrement, Nrf2 pourrait inhiber directement l'expression de ces deux gènes en se fixant sur des éléments ARE dans leurs promoteurs. Cependant, cette hypothèse est peu probable, au moins pour le gène IL12A, car l'analyse du promoteur IL12A avec le logiciel MathInspector montre l'absence de séquences ARE sur lesquelles Nrf2 pourraient se fixer. Deuxièmement, Nrf2 pourrait agir indirectement en stimulant l'expression du facteur de transcription ATF3 dont le promoteur possède des éléments de réponse fonctionnels de type ARE (Kim et al., 2010). En effet, ATF3 exerce des fonctions inhibitrices sur les voies de signalisation activées par le TLR4 (Gilchrist et al., 2006). Il réprime très fortement l'expression des gènes IL6 et IL12B induite par le LPS en induisant des modifications structurales de la chromatine. Ces changements de conformation restreignent l'accès du facteur de transcription NF- κ B à ses éléments de réponse dans les régions régulatrices des promoteurs IL6 et IL12B. Cette seconde hypothèse est également peu probable car l'arsenic et le tBHQ n'augmente pas l'expression d'ATF3 (résultats non montrés) et ne réduisent pas les niveaux des ARNm du gène IL6 dans les DCs activées par le LPS. Troisièmement, Nrf2 pourrait interférer avec les activités transcriptionnelles d'IRF3 et de NF- κ B en modulant la disponibilité de la protéine co-activatrice CBP. En effet, l'expression optimale de l'IL-12p70, induite notamment par IRF3 et la sous-unité p65 NF- κ B, nécessite le recrutement de CBP au niveau du promoteur du gène IL12A (Aksoy et al., 2007). CBP possède une activité histone acétyltransférase qui permet de décompresser la chromatine et de faciliter l'accès des facteurs de transcription à leurs sites de liaison sur l'ADN (Davie et Spencer, 1999). En interagissant physiquement avec IRF3 et p65, mais également avec Nrf2, CBP favorise la liaison de ces facteurs de transcription à la machinerie transcriptionnelle et permet le recrutement de l'ARN polymérase II (Neish et al., 1998). Dans ce contexte, Nrf2 et p65 peuvent entrer en compétition pour interagir avec CBP et finalement antagoniser leur activité transcriptionnelle (Ziady et al., 2012; Liu et al., 2008). Il est démontré que CBP s'associe à IRF3 et

p65 dans les DCs stimulées par le LPS et que ces interactions jouent un rôle majeur dans l'expression du gène IL12A (Aksoy et al., 2007). Nous déterminons actuellement, par des expériences de co-immunoprécipitation, si le tBHQ ou l'arsenic, en activant Nrf2, module l'interaction de p65 et d'IRF3 avec CBP. De plus, nous envisageons des expériences d'immunoprécipitations de la chromatine afin d'étudier le recrutement d'IRF3 et de p65 sur le promoteur du gène IL12A. Si l'arsenic ne bloque pas l'activation de ces facteurs de transcription, il est en revanche possible qu'il limite *in vivo* les interactions avec leurs éléments de réponse spécifiques.

Le rôle de Nrf2 dans les effets répresseurs de l'arsenic a été démontré en exposant des DCs préalablement différenciées dans un milieu de culture sans métalloïde ; le pré-traitement avec l'arsenic a été réalisé juste avant la stimulation avec le LPS. Il est donc opportun de se demander si l'inhibition de l'expression de l'IL-12p70, observée dans les mDCs dérivant de monocytes différenciés en présence d'arsenic, implique également le facteur de transcription Nrf2. Nous n'avons pas résolu cette question. Toutefois, nos résultats indiquent que le niveau des ARNm du gène NQO1 sont en moyenne 2,5 fois plus élevés dans les DCs, préalablement différenciées en présence de 0,25 μ M d'arsénite de sodium puis activées, et que ceux mesurés dans les DCs différenciées en absence de métalloïde. Ce résultat suggère donc que la différenciation des DCs en présence d'arsenic augmente très certainement de façon prolongée et stable l'expression de Nrf2. Cette activité pourrait être suffisante pour prévenir l'augmentation des niveaux d'ARNm du gène IL12A dans les DCs activées. En revanche, ce mécanisme n'est pas impliqué dans la répression de la sécrétion d'IL-23 ; en effet, le métalloïde ne bloque pas l'induction des niveaux d'ARNm du gène IL23A qui régulent la production de la sous-unité p19. Or, l'induction de l'expression du gène IL23A est l'étape limitant la synthèse de l'IL-23. L'arsenic pourrait davantage réprimer la sécrétion de l'IL-23 en modulant le processus de maturation et/ou de transport de cette cytokine.

Une fonction majeure des DCs est d'activer les LTs en interagissant directement et physiquement avec ces cellules et, indirectement, en sécrétant différentes cytokines activatrices telles que l'IL-12p70 et l'IL-23. Nos résultats démontrent que la différenciation des iDCs en présence de 0,25 μ M d'arsenic, réduit secondairement l'aptitude des mDCs à induire la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-17 à partir de LTs allogéniques non exposés au métalloïde. Ces diminutions des niveaux de sécrétion ne résultent pas d'une réduction globale du nombre de LTs car l'arsenic n'altère pas la prolifération des LTs mis en coculture avec ces DCs activées. De plus, comme indiqué précédemment, l'arsenic ne bloque pas l'expression membranaire des molécules de CD80 et CD86 dans les DCs stimulées par le LPS; il ne prévient donc pas la mise en place du signal de costimulation indispensable à l'activation optimale des LTs. La diminution de la production d'IFN- γ et d'IL-17 pourrait résulter de la plus faible sécrétion d'IL-12p70 et d'IL-23, induite par le métalloïde, puisque ces deux cytokines

régulent positivement l'expression de l'IFN- γ et de l'IL-17 dans les LTs activés (Langrish et al., 2004). Pour confirmer le rôle de ces deux cytokines, il serait nécessaire de déterminer si l'ajout d'IL-12p70 ou d'IL-23 recombinante humaine reverse ou non les effets répresseurs de l'arsenic. Quel que soit le mécanisme impliqué, nos résultats démontrent que, par l'intermédiaire de ses effets sur les DCs, l'arsenic peut interférer avec la fonction de sécrétion du LT activé. Au cours de ma thèse, j'ai participé à des travaux de recherche démontrant que le métalloïde peut également impacter directement la physiologie *in vitro* des LTs. Les résultats de ces travaux ont abouti à la publication de deux articles que j'ai introduits en annexe de ce mémoire de thèse. Dans le premier article, nous montrons que des concentrations non cytotoxiques de 1 et 2 μ M d'arsénite de sodium réduisent significativement la prolifération de LTs CD3⁺ costimulés par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Dynabeads Invitrogen). Cet effet est notamment associé à une réduction significative du pourcentage de LTs se divisant plus de trois fois et à une augmentation significative du pourcentage de LTs arrêtés en phase G0/G1. L'arsenic réduit l'expression et la sécrétion d'IL-2 dans les LTs activés, mais il ne prévient pas l'induction de l'expression membranaire des marqueurs CD69 et CD25a. L'inhibition de la production d'IL-2 ne contribue cependant pas à la réduction de la prolifération des LTs car l'ajout d'IL-2 recombinante ne reverse pas les effets anti-prolifératif du métalloïde. Enfin, nous montrons que l'arsenic réduit significativement la sécrétion d'IFN- γ , mais pas celle d'IL-13, lors de l'activation des LTs CD3⁺. Dans le second article, nous démontrons que la polarisation de LTs CD4⁺ en présence d'arsénite de sodium (0,25 à 2 μ M) réprime significativement l'expression et la sécrétion de l'IL-17 et de l'IL-22 dans les cellules Th17. L'arsenic réduit également significativement l'induction des niveaux d'ARNm du gène RORC qui code le facteur de transcription ROR- γ t essentiel à la polarisation Th17 des LTs CD4⁺. Comme nous l'avons observé dans les DCs, l'arsenic ne prévient pas l'activation de la voie NF- κ B dans les LTs CD4⁺, en revanche il diminue significativement les niveaux de phosphorylation de c-Jun. Enfin, nous montrons que le SP600125, un inhibiteur de l'activité JNK, réprime également l'induction des niveaux d'ARNm du gène IL17A. Ces derniers résultats suggèrent donc que l'arsenic pourrait réprimer l'expression du gène IL17A en inhibant la voie JNK/c-Jun.

Au total, les travaux menés par notre équipe démontrent que l'arsenic module considérablement la physiologie *in vitro* d'acteurs cellulaires majeurs de la réponse immunitaire chez l'homme. Le métalloïde réprime différentes fonctions des DCs, des macrophages et des LTs humains en culture primaire. Nos résultats confortent donc l'idée selon laquelle l'arsenic est un composé véritablement immunotoxique. Il est important de souligner que nos résultats obtenus exclusivement *in vitro* peuvent être prédictifs d'effets immunomodulateurs *in vivo* chez l'individu exposé chroniquement. En effet, Banerjee et coll ont publié en 2009 une étude comparant le phénotype de macrophages

différenciés *ex-vivo* à partir de monocytes de sang périphérique collectés chez des individus non exposés ou exposés chroniquement à l'arsenic par la consommation d'eau de boisson contaminée (Banerjee et al., 2009). Leurs résultats démontrent que l'exposition chronique à l'arsenic induit des modifications du phénotype des macrophages tout à fait comparables à celles que nous avons observées lorsque le métalloïde est utilisé *in vitro* (Lemarie et al., 2006b). En particulier, ces macrophages sont moins adhérents, ont une moindre activité de phagocytose et présentent des modifications du cytosquelette d'actine associées à une activation de la voie ROCK/RhoA (Banerjee et al., 2009).

L'ensemble des études menées chez l'homme, chez l'animal ou *in vitro* sur des cellules humaines démontrent que les effets immunotoxiques de l'arsenic sont principalement de nature suppressives. Ces propriétés immunosuppressives pourraient contribuer à certains effets délétères du métalloïde chez l'homme chroniquement exposé, et notamment à ses effets cancérigènes. Il est intéressant de constater que les tumeurs induites par l'arsenic chez l'homme, principalement des carcinomes squameux et basocellulaires, sont de même nature que celles induites par les chimiothérapies immunosuppressives utilisées chez les patients transplantés (Durando et Reichel, 2005). Ainsi, il est bien démontré que ces cancers de la peau constituent un effet secondaire grave et fréquent des médicaments immunosuppresseurs utilisés à long terme chez l'homme. En réduisant la production de cytokines majeures, telles que l'IL-12p70 et l'IFN- γ , et en réprimant la prolifération des LTs, l'arsenic peut altérer les processus d'immunosurveillance anticancéreuse contrôlés par les DCs et LTs activés (Zitvogel et al., 2006). Dans ce cadre, il est démontré depuis de nombreuses années que l'arséniure de gallium (GaAs) augmente très significativement le développement de métastases pulmonaires lorsque des cellules de mélanome B16F10 sont injectées chez la souris (Burns et al., 1993; Sikorski et al., 1989). Par ailleurs, les effets immunosuppresseurs de l'arsenic pourraient favoriser l'augmentation de l'incidence des maladies infectieuses, notamment pulmonaires, observées chez les individus chroniquement exposés au métalloïde. Kozul et coll (2009) ont bien démontré que le traitement de souris avec des concentrations d'arsenic, tout à fait comparables à celles auxquelles l'homme est exposé par la consommation d'eau contaminée, augmente très significativement la charge virale pulmonaire et la mortalité globale lorsque ces souris sont infectées avec le virus H1N1.

Inversement, les effets immunosuppresseurs du métalloïde vis-à-vis de la physiologie des DCs et/ou des LTs pourraient théoriquement contribuer à prévenir le développement de certaines maladies inflammatoires chroniques chez l'homme. En effet, le blocage de l'expression ou de l'action de l'IL-12p70 peut limiter la sévérité de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MCI) et celle du LED (Mannon et al., 2004; Kikawada et al., 2003). Le traitement avec un

anticorps monoclonal ciblant l'IL-12 diminue les symptômes cliniques et induit la rémission de patients atteints de la maladie de Crohn (Mannon et al., 2004). Les effets curatifs de cet anticorps sont associés à une diminution de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules mononuclées de la lamina propria de ces patients. Dans ce contexte thérapeutique, il a été montré récemment que l'arsenic inhibe l'inflammation du côlon dans un modèle de colite murine induite par le TNBS et qu'il réduit les niveaux d'ARNm du gène IL12A dans les extraits de côlon (Singer et al., 2011). Cette étude n'indique cependant pas si l'arsenic inhibe la sécrétion de l'IFN- γ qui favorise la phase initiale des MICI (Strober et Fuss, 2011). Les résultats présentés dans cette thèse indiquent toutefois que l'arsenic peut inhiber la production d'IFN- γ en bloquant directement son expression dans les LTs ou indirectement en réprimant les fonctions des DCs. Par ailleurs, l'IL-23 contribue de façon prépondérante au développement du LED (Kyttaris et al., 2010), de la maladie de Crohn (Neurath, 2007) et de la GVHD (Das et al., 2010), en promouvant la différenciation des LTs Th17. Dans le modèle murin de LED, l'expression de l'IL-17 et celle du récepteur à l'IL-23 dans les LTs doubles négatifs des souris MRL/lpr augmentent avec la progression de la maladie, et cet axe IL-23/IL-17 favorise le développement de néphrite chez ces souris prédisposées (Zhang et al., 2009). Dans le modèle murin de GVHD, la transplantation de moelle osseuse de souris déficientes en IL-23, ou l'administration d'un anticorps dirigé contre l'IL-23, prévient l'induction de l'expression de l'IL-17, diminue les dommages tissulaires dans le côlon et augmente la survie des souris (Das et al., 2009, 2010). L'expression de l'IL-23 est également conséquente dans les muqueuses de patients souffrant de MICI, et le blocage de sa production diminue significativement l'infiltration de cellules Th17, les réponses inflammatoires et la cytotoxicité tissulaire (Liu et al., 2011). Les données que nous avons obtenues au cours de ce travail de thèse montrent que l'arsenic peut réduire drastiquement la production d'IL-17, directement en inhibant son expression dans les LTs Th17 mais également indirectement en réprimant la sécrétion d'IL-6 et d'IL-23 par les DCs activées. Les travaux de Singer et coll (2011) démontrent que l'arsenic peut aussi inhiber les niveaux d'ARNm des gènes IL17A et IL23A *in vivo* dans les tissus coliques de souris souffrant de colites induites par le TNBS. Enfin, des données récentes montrent que l'IL-17, produite par des cellules Th17, contribue très fortement au développement et à la progression de la polyarthrite rhumatoïde (Miossec et Kolls, 2012). L'IL-17 entretient le processus inflammatoire à long terme en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et l'IL-8 par les cellules épithéliales et les fibroblastes. D'autre part, elle accroît les lésions des cartilages et des os en activant la sécrétion de métalloprotéinases par les macrophages et les DCs, et en renforçant l'ostéoclastogénèse. L'administration d'anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-17 permet non seulement de réduire les dommages tissulaires dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde (Lubberts et al., 2004) mais également d'améliorer les

signes cliniques et les symptômes chez des patients atteints de cette maladie chronique (Genovese et al., 2010). Ces données suggèrent qu'en inhibant l'axe IL-23/Th17, l'arsenic inorganique pourrait prévenir efficacement le développement de la polyarthrite rhumatoïde. Cependant, aucune publication n'a aujourd'hui rapporté le potentiel « thérapeutique » de ce métalloïde dans un modèle expérimental murin de polyarthrite rhumatoïde.

Nos résultats démontrent que l'arsénite de sodium inhibe très significativement la sécrétion de différentes cytokines humaines à des concentrations tout à fait compatibles avec les taux plasmatiques d'arsenic mesurés chez les patients traités par le Trisenox (0,15 mg/kg/j). Ces concentrations plasmatiques d'arsenic sont efficaces pour éliminer les cellules leucémiques et généralement bien tolérées par le patient. L'hôpital de Nantes pilote actuellement l'essai clinique de phase 2a LUPSENIC qui vise à déterminer la tolérance, et les effets biologiques et cliniques, du trioxyde d'arsenic administré par voie intraveineuse, à des doses allant de 0,075 à 0,30 mg/kg/j, chez des adultes atteints de lupus systémique (LED) (clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01738360). Le protocole comporte un traitement initial de 4 jours puis 6 nouvelles injections à J8, J11, J15, J18, J22 et J25. Les résultats de ce premier essai seront très importants pour déterminer si le trioxyde d'arsenic peut être utilisé à plus long terme pour traiter cette pathologie chronique. En effet, contrairement au traitement de l'APL, la prise en charge thérapeutique des maladies auto-immunes, telle que celle du LED, nécessite d'administrer une chimiothérapie immunosuppressive sur plusieurs mois ou plusieurs années. Etant donné la toxicité chronique connue de l'arsenic inorganique, Il semble très important de pouvoir déterminer si le trioxyde d'arsenic peut être utilisé de façon cyclique sur le long terme.

En conclusion, l'ensemble des travaux réalisés au cours de mon travail de thèse a permis d'approfondir nos connaissances sur les propriétés immunotoxiques de l'arsenic inorganique. Nos résultats démontrent que ce métalloïde altère profondément la physiologie *in vitro* des DCs et des LTs humains. Ils suggèrent que cette immunotoxicité peut contribuer d'une part aux effets toxiques du métalloïde chez les individus chroniquement exposés et d'autre part à des effets « thérapeutiques » vis-à-vis de maladies inflammatoires chroniques. Enfin, notre travail met en évidence le rôle majeur du facteur de transcription Nrf2 dans les effets immunosuppresseurs de l'arsenic inorganique et du tBHQ. La protéine Nrf2 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante à considérer pour élaborer de nouveaux traitements contre les maladies auto-immunes. Cette protéine semble jouer un rôle protecteur important dans la polyarthrite rhumatoïde. En particulier, cette pathologie induit des dommages des cartilages et des os beaucoup plus sévères chez la souris KO pour le gène Nrf2 que ceux induits chez la souris sauvage (Wruck et al., 2011). De plus, le sulforaphane, un inducteur non sélectif de la voie Nrf2, réduit le développement de la polyarthrite

rhumatoïde chez la souris et inhibe puissamment la sécrétion *ex vivo* de TNF- α et d'IL-17 à partir de LTs issus de patients souffrant de cette maladie (Kong et al., 2010). Il pourrait donc être intéressant de synthétiser des substances chimiques activant plus spécifiquement Nrf2 et d'évaluer leurs effets biologiques dans différents modèles de pathologies inflammatoires chroniques.

Bibliographie

- Aggarwal, M., Narahariseti, S.B., Dandapat, S., Degen, G.H., and Malik, J.K. (2008). Perturbations in immune responses induced by concurrent subchronic exposure to arsenic and endosulfan. *Toxicology* 251, 51–60.
- Ahsan, H., Chen, Y., Parvez, F., Zablotska, L., Argos, M., Hussain, I., Momotaj, H., Levy, D., Cheng, Z., Slavkovich, V., et al. (2006). Arsenic exposure from drinking water and risk of premalignant skin lesions in Bangladesh: baseline results from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study. *Am. J. Epidemiol.* 163, 1138–1148.
- Aksoy, E., Albarani, V., Nguyen, M., Laes, J.-F., Ruelle, J.-L., De Wit, D., Willems, F., Goldman, M., and Goriely, S. (2007). Interferon regulatory factor 3-dependent responses to lipopolysaccharide are selectively blunted in cord blood cells. *Blood* 109, 2887–2893.
- Almand, B., Resser, J.R., Lindman, B., Nadaf, S., Clark, J.I., Kwon, E.D., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (2000). Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 1755–1766.
- Alters, S.E., Gadea, J.R., Holm, B., Lebkowski, J., and Philip, R. (1999). IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 22, 229–236.
- Alvarez, Y., Rodríguez, M., Municio, C., Hugo, E., Alonso, S., Ibarrola, N., Fernández, N., and Crespo, M.S. (2012). Sirtuin 1 is a key regulator of the interleukin-12 p70/interleukin-23 balance in human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 287, 35689–35701.
- Andrew, A.S., Jewell, D.A., Mason, R.A., Whitfield, M.L., Moore, J.H., and Karagas, M.R. (2008). Drinking-water arsenic exposure modulates gene expression in human lymphocytes from a U.S. population. *Environ. Health Perspect.* 116, 524–531.
- Aono, J., Yanagawa, T., Itoh, K., Li, B., Yoshida, H., Kumagai, Y., Yamamoto, M., and Ishii, T. (2003). Activation of Nrf2 and accumulation of ubiquitinated A170 by arsenic in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 271–277.
- Aposhian, H.V., Zakharyan, R.A., Avram, M.D., Sampayo-Reyes, A., and Wollenberg, M.L. (2004). A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 327–335.
- Ardavín, C., Martínez del Hoyo, G., Martín, P., Anjuère, F., Arias, C.F., Marín, A.R., Ruiz, S., Parrillas, V., and Hernández, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 22, 691–700.
- Argos, M., Kibriya, M.G., Parvez, F., Jasmine, F., Rakibuz-Zaman, M., and Ahsan, H. (2006). Gene expression profiles in peripheral lymphocytes by arsenic exposure and skin lesion status in a Bangladeshi population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 15, 1367–1375.
- Argos, M., Kalra, T., Rathouz, P.J., Chen, Y., Pierce, B., Parvez, F., Islam, T., Ahmed, A., Rakibuz-Zaman, M., Hasan, R., et al. (2010). Arsenic exposure from drinking water, and all-cause and chronic-disease mortalities in Bangladesh (HEALS): a prospective cohort study. *Lancet* 376, 252–258.
- ATDSR (2007). Toxicological profil for arsenic
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Banerjee, N., Banerjee, S., Sen, R., Bandyopadhyay, A., Sarma, N., Majumder, P., Das, J.K., Chatterjee, M., Kabir, S.N., and Giri, A.K. (2009). Chronic arsenic exposure impairs macrophage functions in the exposed individuals. *J. Clin. Immunol.* 29, 582–594.
- Barbey, J.T., Pezzullo, J.C., and Soignet, S.L. (2003). Effect of Arsenic Trioxide on QT Interval in Patients With Advanced Malignancies. *J. Clin. Oncol.* 21, 3609–3615.

- Barton, G.M., and Kagan, J.C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 535–542.
- Belz, G.T., and Nutt, S.L. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 101–113.
- Betelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 453, 1051–1057.
- Bhalla, S., Gordon, L.I., David, K., Prachand, S., Singh, A.T.K., Yang, S., Winter, J.N., Guo, D., O'Halloran, T., Platanias, L.C., et al. (2010). Glutathione Depletion Enhances Arsenic Trioxide-Induced Apoptosis in Lymphoma Cells Through Mitochondrial-Independent Mechanisms. *Br. J. Haematol.* 150, 365–369.
- Bhattacharjee, P., Banerjee, M., and Giri, A.K. (2013). Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ. Int.* 53, 29–40.
- Biswas, R., Ghosh, P., Banerjee, N., Das, J.K., Sau, T., Banerjee, A., Roy, S., Ganguly, S., Chatterjee, M., Mukherjee, A., et al. (2008). Analysis of T-cell proliferation and cytokine secretion in the individuals exposed to arsenic. *Hum. Exp. Toxicol.* 27, 381–386.
- Bloom, D.A., and Jaiswal, A.K. (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by Protein Kinase C in Response to Antioxidants Leads to the Release of Nrf2 from INrf2, but Is Not Required for Nrf2 Stabilization/Accumulation in the Nucleus and Transcriptional Activation of Antioxidant Response Element-mediated NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 278, 44675–44682.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2002). The paradox of arsenic: molecular mechanisms of cell transformation and chemotherapeutic effects. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 5–24.
- Bourdonnay, E., Morzadec, C., Fardel, O., and Vernhet, L. (2009). Redox-sensitive regulation of gene expression in human primary macrophages exposed to inorganic arsenic. *J. Cell. Biochem.* 107, 537–547.
- Bourdonnay, E., Morzadec, C., Fardel, O., and Vernhet, L. (2011). Arsenic increases lipopolysaccharide-dependent expression of interleukin-8 gene by stimulating a redox-sensitive pathway that strengthens p38-kinase activation. *Mol. Immunol.* 48, 2069–2078.
- Bredfeldt, T.G., Jagadish, B., Eblin, K.E., Mash, E.A., and Gandolfi, A.J. (2006). Monomethylarsonous acid induces transformation of human bladder cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 69–79.
- Brennan, F.M., Maini, R.N., and Feldmann, M. (1998). Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* 20, 133–147.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., Jr, and Krause, K.-H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.* 142, w13659.
- Brigelius-Flohé, R., and Flohé, L. (2011). Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxidants Redox Signal.* 15, 2335–2381.
- Bromley, S.K., Burack, W.R., Johnson, K.G., Somersalo, K., Sims, T.N., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (2001). The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 375–396.
- Bryan, H.K., Olayanju, A., Goldring, C.E., and Park, B.K. (2013). The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.* 85, 705–717.
- Burns, L.A., McCay, J.A., Brown, R., and Munson, A.E. (1993). Arsenic in the sera of gallium arsenide-exposed mice inhibits bacterial growth and increases host resistance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 795–800.
- Cai, X., Shen, Y.L., Zhu, Q., Jia, P.M., Yu, Y., Zhou, L., Huang, Y., Zhang, J.W., Xiong, S.M., Chen, S.J., et al. (2000). Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 14, 262–270.

- Cao, W., Lee, S.H., and Lu, J. (2005). CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem. J.* 385, 85–93.
- Cao, X., Sugita, M., Wel, N. van der, Lai, J., Rogers, R.A., Peters, P.J., and Brenner, M.B. (2002). CD1 Molecules Efficiently Present Antigen in Immature Dendritic Cells and Traffic Independently of MHC Class II During Dendritic Cell Maturation. *J. Immunol.* 169, 4770–4777.
- Cavigelli, M., Li, W.W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K., and Karin, M. (1996). The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *Embo J.* 15, 6269–6279.
- Chakraborty, S., Ray, M., and Ray, S. (2009). Evaluation of phagocytic activity and nitric oxide generation by molluscan haemocytes as biomarkers of inorganic arsenic exposure. *Biomarkers Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 14, 539–546.
- Chan, K., and Kan, Y.W. (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12731–12736.
- Chan, R.C.-F., Wang, M., Li, N., Yanagawa, Y., Onoé, K., Lee, J.J., and Nel, A.E. (2006). Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cell responses involved in T-helper differentiation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 455–465.
- Chanda, S., Dasgupta, U.B., GuhaMazumder, D., Gupta, M., Chaudhuri, U., Lahiri, S., Das, S., Ghosh, N., and Chatterjee, D. (2006). DNA Hypermethylation of Promoter of Gene p53 and p16 in Arsenic-Exposed People with and without Malignancy. *Toxicol. Sci.* 89, 431–437.
- Chapman, H.D., and Johnson, Z.B. (2002). Use of antibiotics and roxarsone in broiler chickens in the USA: analysis for the years 1995 to 2000. *Poult. Sci.* 81, 356–364.
- Chen, G.Q., Shi, X.G., Tang, W., Xiong, S.M., Zhu, J., Cai, X., Han, Z.G., Ni, J.H., Shi, G.Y., Jia, P.M., et al. (1997). Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89, 3345–3353.
- Chen, S.-J., Zhou, G.-B., Zhang, X.-W., Mao, J.-H., Thé, H. de, and Chen, Z. (2011). From an old remedy to a magic bullet: molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of arsenic in fighting leukemia. *Blood* 117, 6425–6437.
- Chen, Y., Parvez, F., Gamble, M., Islam, T., Ahmed, A., Argos, M., Graziano, J.H., and Ahsan, H. (2009). Arsenic exposure at low-to-moderate levels and skin lesions, arsenic metabolism, neurological functions, and biomarkers for respiratory and cardiovascular diseases: Review of recent findings from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study (HEALS) in Bangladesh. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 184–192.
- Chou, W.-C., Hawkins, A.L., Barrett, J.F., Griffin, C.A., and Dang, C.V. (2001). Arsenic inhibition of telomerase transcription leads to genetic instability. *J. Clin. Invest.* 108, 1541–1547.
- Chou, W.-C., Jie, C., Kenedy, A.A., Jones, R.J., Trush, M.A., and Dang, C.V. (2004). Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4578–4583.
- Cohen, S.M., Arnold, L.L., Eldan, M., Lewis, A.S., and Beck, B.D. (2006). Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 99–133.
- Concha, G., Vogler, G., Nermell, B., and Vahter, M. (1998). Low-level arsenic excretion in breast milk of native Andean women exposed to high levels of arsenic in the drinking water. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 71, 42–46.
- Conde, P., Acosta-Saavedra, L.C., Goytia-Acevedo, R.C., and Calderon-Aranda, E.S. (2007). Sodium arsenite-induced inhibition of cell proliferation is related to inhibition of IL-2 mRNA expression in mouse activated T cells. *Arch. Toxicol.* 81, 251–259.
- Conti, L., and Gessani, S. (2008). GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. *Immunobiology* 213, 859–870.

- Copple, I.M., Goldring, C.E., Kitteringham, N.R., and Park, B.K. (2010). The keap1-nrf2 cellular defense pathway: mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity. *Handb. Exp. Pharmacol.* 233–266.
- Daro, E., Pulendran, B., Brasel, K., Teepe, M., Pettit, D., Lynch, D.H., Vremec, D., Robb, L., Shortman, K., McKenna, H.J., et al. (2000). Polyethylene Glycol-Modified GM-CSF Expands CD11b^{high}CD11c^{high} But Not CD11b^{low}CD11c^{high} Murine Dendritic Cells In Vivo: A Comparative Analysis with Flt3 Ligand. *J. Immunol.* 165, 49–58.
- Das, R., Chen, X., Komorowski, R., Hessner, M.J., and Drobyski, W.R. (2009). Interleukin-23 secretion by donor antigen-presenting cells is critical for organ-specific pathology in graft-versus-host disease. *Blood* 113, 2352–2362.
- Das, R., Komorowski, R., Hessner, M.J., Subramanian, H., Huettner, C.S., Cua, D., and Drobyski, W.R. (2010). Blockade of interleukin-23 signaling results in targeted protection of the colon and allows for separation of graft-versus-host and graft-versus-leukemia responses. *Blood* 115, 5249–5258.
- Davie, J.R., and Spencer, V.A. (1999). Control of histone modifications. *J. Cell. Biochem. Suppl* 32–33, 141–148.
- Davies, K.J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *Iubmb Life* 50, 279–289.
- Dinareello, C.A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503–508.
- Duker, A.A., Carranza, E.J.M., and Hale, M. (2005). Arsenic geochemistry and health. *Environ. Int.* 31, 631–641.
- Durando, B., and Reichel, J. (2005). The relative effects of different systemic immunosuppressives on skin cancer development in organ transplant patients. *Dermatol. Ther.* 18, 1–11.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)(2009); Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal*; 7(10):1351. [199 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2009.1351.
- Endo, H., Sugioka, Y., Nakagi, Y., Saijo, Y., and Yoshida, T. (2008). A novel role of the NRF2 transcription factor in the regulation of arsenite-mediated keratin 16 gene expression in human keratinocytes. *Environ. Health Perspect.* 116, 873–879.
- Enomoto, A., Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., Harada, T., and Yamamoto, M. (2001). High Sensitivity of Nrf2 Knockout Mice to Acetaminophen Hepatotoxicity Associated with Decreased Expression of ARE-Regulated Drug Metabolizing Enzymes and Antioxidant Genes. *Toxicol. Sci.* 59, 169–177.
- Fang, J., Chen, S.-J., Tong, J.-H., Wang, Z.-G., Chen, G.-Q., and Chen, Z. (2002). Treatment of acute promyelocytic leukemia with ATRA and As₂O₃: a model of molecular target-based cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* 1, 614–620.
- Ficker, E., Kuryshv, Y.A., Dennis, A.T., Obejero-Paz, C., Wang, L., Hawryluk, P., Wible, B.A., and Brown, A.M. (2004). Mechanisms of arsenic-induced prolongation of cardiac repolarization. *Mol. Pharmacol.* 66, 33–44.
- Flora, S.J.S. (2011). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 257–281.
- Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R., and Weiss, A. (1991). Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251, 313–316.
- Galicia, G., Leyva, R., Tenorio, E.P., Ostrosky-Wegman, P., and Saavedra, R. (2003). Sodium arsenite retards proliferation of PHA-activated T cells by delaying the production and secretion of IL-2. *Int. Immunopharmacol.* 3, 671–682.
- Garcia-Vallejo, J.J., and van Kooyk, Y. (2013). The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. *Trends Immunol.* 34, 482–486.
- Gately, M.K., Desai, B.B., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Dwyer, C.M., Podlaski, F.J., Familletti, P.C., Sinigaglia, F., Chizzonite, R., and Gubler, U. (1991). Regulation of human lymphocyte

- proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.* *147*, 874–882.
- Genovese, M.C., Van den Bosch, F., Roberson, S.A., Bojin, S., Biagini, I.M., Ryan, P., and Sloan-Lancaster, J. (2010). LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.* *62*, 929–939.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L.A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R.T., Consolaro, M.R., De Marchi, M., Giachino, D., Robbiano, A., et al. (2008). Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J. Exp. Med.* *205*, 1447–1461.
- Gilchrist, M., Thorsson, V., Li, B., Rust, A.G., Korb, M., Roach, J.C., Kennedy, K., Hai, T., Bolouri, H., and Aderem, A. (2006). Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* *441*, 173–178.
- Goldring, C.E.P., Kitteringham, N.R., Elsby, R., Randle, L.E., Clement, Y.N., Williams, D.P., McMahon, M., Hayes, J.D., Itoh, K., Yamamoto, M., et al. (2004). Activation of hepatic Nrf2 in vivo by acetaminophen in CD-1 mice. *Hepatology* *39*, 1267–1276.
- Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J.L.F.C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* *65*, 45–80.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Montero, R., Garcia-Vargas, G., Del Razo, L.M., Albores, A., Cebrian, M.E., and Ostrosky-Wegman, P. (1994). Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutat. Res.* *313*, 293–299.
- Goriely, S., Demonté, D., Nizet, S., De Wit, D., Willems, F., Goldman, M., and Van Lint, C. (2003). Human IL-12(p35) gene activation involves selective remodeling of a single nucleosome within a region of the promoter containing critical Sp1-binding sites. *Blood* *101*, 4894–4902.
- Goriely, S., Lint, C.V., Dadkhah, R., Libin, M., Wit, D.D., Demonté, D., Willems, F., and Goldman, M. (2004). A Defect in Nucleosome Remodeling Prevents IL-12(p35) Gene Transcription in Neonatal Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* *199*, 1011–1016.
- Goriely, S., Molle, C., Nguyen, M., Albarani, V., Haddou, N.O., Lin, R., De Wit, D., Flamand, V., Willems, F., and Goldman, M. (2006). Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood* *107*, 1078–1084.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 515–548.
- Guha, M., and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* *13*, 85–94.
- Guo, X., Liu, Z., Huang, C., and You, L. (2006). Levels of arsenic in drinking-water and cutaneous lesions in Inner Mongolia. *J. Health Popul. Nutr.* *24*, 214–220.
- Gupta, S.C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., and Aggarwal, B.B. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants Redox Signal.* *16*, 1295–1322.
- Hall, M.N., and Gamble, M.V. (2012). Nutritional manipulation of one-carbon metabolism: effects on arsenic methylation and toxicity. *J. Toxicol.* *2012*, 595307.
- Hamadani, J.D., Tofail, F., Nermell, B., Gardner, R., Shiraji, S., Bottai, M., Arifeen, S.E., Huda, S.N., and Vahter, M. (2011). Critical windows of exposure for arsenic-associated impairment of cognitive function in pre-school girls and boys: a population-based cohort study. *Int. J. Epidemiol.* *40*, 1593–1604.
- Hayakawa, T., Kobayashi, Y., Cui, X., and Hirano, S. (2005). A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch. Toxicol.* *79*, 183–191.
- Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M.N., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., and Villadangos, J.A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.* *199*, 9–26.

- Huang, C., Ma, W.Y., Li, J., and Dong, Z. (1999). Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH2-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Res.* 59, 3053–3058.
- Huang, H.-C., Nguyen, T., and Pickett, C.B. (2002). Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 42769–42774.
- Hughes, M.F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133, 1–16.
- Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2008). Structural Basis for Sorting Mechanism of p62 in Selective Autophagy. *J. Biol. Chem.* 283, 22847–22857.
- Islam, R., Khan, I., Hassan, S.N., McEvoy, M., D’Este, C., Attia, J., Peel, R., Sultana, M., Akter, S., and Milton, A.H. (2012). Association between type 2 diabetes and chronic arsenic exposure in drinking water: a cross sectional study in Bangladesh. *Environ. Heal. Glob. Access Sci. Source* 11, 38.
- Jain, A.K., and Jaiswal, A.K. (2007). GSK-3 β Acts Upstream of Fyn Kinase in Regulation of Nuclear Export and Degradation of NF-E2 Related Factor 2. *J. Biol. Chem.* 282, 16502–16510.
- Jing, Y., Dai, J., Chalmers-Redman, R.M., Tatton, W.G., and Waxman, S. (1999). Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* 94, 2102–2111.
- Jones, F.T. (2007). A broad view of arsenic. *Poult. Sci.* 86, 2–14.
- Kadowaki, N. (2007). Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* 56, 193–199.
- Kastelein, R.A., Hunter, C.A., and Cua, D.J. (2007). Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 221–242.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., et al. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19–28.
- Kavian, N., Marut, W., Servettaz, A., Laude, H., Nicco, C., Chéreau, C., Weill, B., and Batteux, F. (2012a). Arsenic trioxide prevents murine sclerodermatous graft-versus-host disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 5142–5149.
- Kavian, N., Marut, W., Servettaz, A., Nicco, C., Chéreau, C., Lemaréchal, H., Borderie, D., Dupin, N., Weill, B., and Batteux, F. (2012b). Reactive oxygen species-mediated killing of activated fibroblasts by arsenic trioxide ameliorates fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 64, 3430–3440.
- Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2008). Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat. Immunol.* 9, 684–691.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 137–145.
- Kikawada, E., Lenda, D.M., and Kelley, V.R. (2003). IL-12 Deficiency in MRL-Fas^{lpr} Mice Delays Nephritis and Intrarenal IFN- γ Expression, and Diminishes Systemic Pathology. *J. Immunol.* 170, 3915–3925.
- Kikuchi, G., Yoshida, T., and Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 558–567.
- Kim, K.-H., Jeong, J.-Y., Surh, Y.-J., and Kim, K.-W. (2010). Expression of stress-response ATF3 is mediated by Nrf2 in astrocytes. *Nucleic Acids Res.* 38, 48–59.
- Kingston, D., Schmid, M.A., Onai, N., Obata-Onai, A., Baumjohann, D., and Manz, M.G. (2009). The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood* 114, 835–843.
- Kitchin, K.T. (2001). Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 249–261.

- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., et al. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213–223.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 566–573.
- Kong, J.-S., Yoo, S.-A., Kim, H.-S., Kim, H.A., Yea, K., Ryu, S.-H., Chung, Y.-J., Cho, C.-S., and Kim, W.-U. (2010). Inhibition of synovial hyperplasia, rheumatoid T cell activation, and experimental arthritis in mice by sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate. *Arthritis Rheum.* 62, 159–170.
- Kono, H., and Rock, K.L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 279–289.
- Kozul, C.D., Ely, K.H., Enelow, R.I., and Hamilton, J.W. (2009). Low-dose arsenic compromises the immune response to influenza A infection in vivo. *Environ. Health Perspect.* 117, 1441–1447.
- Kritharis, A., Bradley, T.P., and Budman, D.R. (2013). The evolving use of arsenic in pharmacotherapy of malignant disease. *Ann. Hematol.* 92, 719–730.
- Kurtz, J., Raval, F., Vallot, C., Der, J., and Sykes, M. (2009). CTLA-4 on alloreactive CD4 T cells interacts with recipient CD80/86 to promote tolerance. *Blood* 113, 3475–3484.
- Kushwah, R., and Hu, J. (2011). Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* 133, 409–419.
- Kyttaris, V.C., Zhang, Z., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Tsokos, G.C. (2010). Cutting edge: IL-23 receptor deficiency prevents the development of lupus nephritis in C57BL/6-lpr/lpr mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4605–4609.
- Laar, L. van de, Coffey, P.J., and Woltman, A.M. (2012). Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119, 3383–3393.
- Langrish, C.L., McKenzie, B.S., Wilson, N.J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2004). IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 202, 96–105.
- Lau, A., Zheng, Y., Tao, S., Wang, H., Whitman, S.A., White, E., and Zhang, D.D. (2013a). Arsenic Inhibits Autophagic Flux, Activating the Nrf2-Keap1 Pathway in a p62-Dependent Manner. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2436–2446.
- Lau, A., Tian, W., Whitman, S.A., and Zhang, D.D. (2013b). The Predicted Molecular Weight of Nrf2: It Is What It Is Not. *Antioxidants Redox Signal.* 18, 91–93.
- Lee, C.-H., Hong, C.-H., Yu, C.-L., Wang, L.-F., Clausen, B.E., Liao, W.-T., Huang, S.-K., Chen, G.-S., and Yu, H.-S. (2012). Arsenic mobilizes Langerhans cell migration and induces Th1 response in epicutaneous protein sensitization via CCL21: a plausible cause of decreased Langerhans cells in arsenic-induced intraepithelial carcinoma. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1290–1299.
- Lemarie, A., Morzadec, C., Mérino, D., Micheau, O., Fardel, O., and Vernhet, L. (2006a). Arsenic trioxide induces apoptosis of human monocytes during macrophagic differentiation through nuclear factor-kappaB-related survival pathway down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 304–314.
- Lemarie, A., Morzadec, C., Bourdonnay, E., Fardel, O., and Vernhet, L. (2006b). Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 3019–3027.
- Lemarie, A., Bourdonnay, E., Morzadec, C., Fardel, O., and Vernhet, L. (2008). Inorganic arsenic activates reduced NADPH oxidase in human primary macrophages through a Rho kinase/p38 kinase pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 6010–6017.

- Laperche V., Bodéan F., Dictor M.C. et Baranger Ph. (2003) - Guide méthodologique de l'arsenic, appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BRGM/RP-52066-FR
- Lengfelder, E., Hofmann, W.-K., and Nowak, D. (2012). Impact of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 26, 433–442.
- Leslie, E.M. (2012). Arsenic-glutathione conjugate transport by the human multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs). *J. Inorg. Biochem.* 108, 141–149.
- De Libero, G., and Mori, L. (2005). Recognition of lipid antigens by T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 485–496.
- Liu, G.-H., Qu, J., and Shen, X. (2008). NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 713–727.
- Liu, Z., Boles, E., and Rosen, B.P. (2004). Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 17312–17318.
- Liu, Z., Yadav, P.K., Xu, X., Su, J., Chen, C., Tang, M., Lin, H., Yu, J., Qian, J., Yang, P.-C., et al. (2011). The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J. Leukoc. Biol.* 89, 597–606.
- Loebenstein, J.R. (1994). The Materials Flow of Arsenic in the United States (United States Department of the Interior, Bureau of Mines).
- Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30, 42–59.
- Lu, S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3143–3153.
- Lu, H.T., Yang, D.D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (1999). Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *Embo J.* 18, 1845–1857.
- Lubberts, E., Koenders, M.I., and Berg, W.B. van den (2004). The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res. Ther.* 7, 29.
- Mancuso, G., Gambuzza, M., Midiri, A., Biondo, C., Papasergi, S., Akira, S., Teti, G., and Beninati, C. (2009). Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 587–594.
- Mannon, P.J., Fuss, I.J., Mayer, L., Elson, C.O., Sandborn, W.J., Present, D., Dolin, B., Goodman, N., Groden, C., Hornung, R.L., et al. (2004). Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 2069–2079.
- Mathas, S., Lietz, A., Janz, M., Hinz, M., Jundt, F., Scheidereit, C., Bommert, K., and Dörken, B. (2003). Inhibition of NF-κB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood* 102, 1028–1034.
- Mathieu, J., and Besançon, F. (2006). Clinically tolerable concentrations of arsenic trioxide induce p53-independent cell death and repress NF-κB activation in Ewing sarcoma cells. *Int. J. Cancer* 119, 1723–1727.
- Matschullat, J. (2000). Arsenic in the geosphere--a review. *Sci. Total Environ.* 249, 297–312.
- Mazumder, D.N.G. (2005). Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 169–175.
- McAdam, A.J., Schweitzer, A.N., and Sharpe, A.H. (1998). The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* 165, 231–247.
- Mead, M.N. (2005). Arsenic: In Search of an Antidote to a Global Poison. *Environ. Health Perspect.* 113, A378–A386.
- Miller, W.H., Jr, Schipper, H.M., Lee, J.S., Singer, J., and Waxman, S. (2002). Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* 62, 3893–3903.
- Milton, A.H., Smith, W., Rahman, B., Hasan, Z., Kulsum, U., Dear, K., Rakibuddin, M., and Ali, A. (2005). Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in bangladesh. *Epidemiol. Camb. Mass* 16, 82–86.

- Miossec, P., and Kolls, J.K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 763–776.
- Mohamadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chalouni, C., Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A.K., and Banchereau, J. (2001). Interleukin 15 Skews Monocyte Differentiation into Dendritic Cells with Features of Langerhans Cells. *J. Exp. Med.* *194*, 1013–1020.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., and Kan, Y.W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 9926–9930.
- Molénat, N., Holeman, M., and Pinel, R. (2000). L'arsenic, polluant de l'environnement: origines, distribution, biotransformations. 12–23.
- Morales, A.A., Gutman, D., Cejas, P.J., Lee, K.P., and Boise, L.H. (2009). Reactive Oxygen Species Are Not Required for an Arsenic Trioxide-induced Antioxidant Response or Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *284*, 12886–12895.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *136*, 2348–2357.
- Motz, G.T., and Coukos, G. (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* *39*, 61–73.
- Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. (2003). IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 5986–5990.
- Nasr, R., Rosenwald, A., El-Sabban, M.E., Arnulf, B., Zalloua, P., Lepelletier, Y., Bex, F., Hermine, O., Staudt, L., Thé, H. de, et al. (2003). Arsenic/interferon specifically reverses 2 distinct gene networks critical for the survival of HTLV-1-infected leukemic cells. *Blood* *101*, 4576–4582.
- Neish, A.S., Anderson, S.F., Schlegel, B.P., Wei, W., and Parvin, J.D. (1998). Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res.* *26*, 847–853.
- Neurath, M.F. (2007). IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat. Med.* *13*, 26–28.
- Niu, C., Yan, H., Yu, T., Sun, H.P., Liu, J.X., Li, X.S., Wu, W., Zhang, F.Q., Chen, Y., Zhou, L., et al. (1999). Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* *94*, 3315–3324.
- Nohara, K., Ao, K., Miyamoto, Y., Suzuki, T., Imaizumi, S., Tateishi, Y., Omura, S., Tohyama, C., and Kobayashi, T. (2008). Arsenite-Induced Thymus Atrophy is Mediated by Cell Cycle Arrest: A Characteristic Downregulation of E2F-Related Genes Revealed by a Microarray Approach. *Toxicol. Sci.* *101*, 226–238.
- Norbury, C.C., Chambers, B.J., Prescott, A.R., Ljunggren, H.G., and Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *27*, 280–288.
- Nordenson, I., Beckman, G., Beckman, L., and Nordström, S. (1978). Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden IV. Chromosomal aberrations in workers exposed to lead. *Hereditas* *88*, 263–267.
- Nordenson, I., Salmonsson, S., Brun, E., and Beckman, G. (1979). Chromosome aberrations in psoriatic patients treated with arsenic. *Hum. Genet.* *48*, 1–6.
- O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Pooley, J., Evans, R., Woulfe, S., and Shortman, K. (2002). Effects of administration of progenipoiectin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice. *Blood* *99*, 2122–2130.
- Oestreich, K.J., and Weinmann, A.S. (2012). Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* *24*, 191–195.

- Ohno, K., Yanase, T., Matsuo, Y., Kimura, T., Hamidur Rahman, M., Magara, Y., and Matsui, Y. (2007). Arsenic intake via water and food by a population living in an arsenic-affected area of Bangladesh. *Sci. Total Environ.* 381, 68–76.
- Okoji, R.S., Yu, R.C., Maronpot, R.R., and Froines, J.R. (2002). Sodium arsenite administration via drinking water increases genome-wide and Ha-ras DNA hypomethylation in methyl-deficient C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* 23, 777–785.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., et al. (2000). Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715–725.
- Osburn, W.O., Karim, B., Dolan, P.M., Liu, G., Yamamoto, M., Huso, D.L., and Kensler, T.W. (2007). Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment. *Int. J. Cancer* 121, 1883–1891.
- Ostrosky-Wegman, P., Gensebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., García-Vargas, G., del Razo, L.M., et al. (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 250, 477–482.
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 71–109.
- Palacios, E.H., and Weiss, A. (2004). Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 23, 7990–8000.
- Parvez, F., Wasserman, G.A., Factor-Litvak, P., Liu, X., Slavkovich, V., Siddique, A.B., Sultana, R., Sultana, R., Islam, T., Levy, D., et al. (2011). Arsenic Exposure and Motor Function among Children in Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* 119, 1665–1670.
- Patterson, R., Vega, L., Trouba, K., Bortner, C., and Germolec, D. (2004). Arsenic-induced alterations in the contact hypersensitivity response in Balb/c mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 434–443.
- Pelicano, H., Feng, L., Zhou, Y., Carew, J.S., Hileman, E.O., Plunkett, W., Keating, M.J., and Huang, P. (2003). Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 37832–37839.
- Pi, J., Kumagai, Y., Sun, G., Yamauchi, H., Yoshida, T., Iso, H., Endo, A., Yu, L., Yuki, K., Miyauchi, T., et al. (2000). Decreased serum concentrations of nitric oxide metabolites among Chinese in an endemic area of chronic arsenic poisoning in inner Mongolia. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1137–1142.
- Poëy, J., and Philibert, C. (2000). Toxicité des métaux. *Rev. Française Lab.* 2000, 35–43.
- Prechtel, A.T., Turza, N.M., Theodoridis, A.A., and Steinkasserer, A. (2007). CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 5454–5464.
- Pulendran, B., Tang, H., and Manicassamy, S. (2010). Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat. Immunol.* 11, 647–655.
- Qu, M., Muller, H.K., and Woods, G.M. (1997). Chemical carcinogens and antigens contribute to cutaneous tumor promotion by depleting epidermal Langerhans cells. *Carcinogenesis* 18, 1277–1279.
- Qu, X., Du, J., Zhang, C., Fu, W., Xi, H., Zou, J., and Hou, J. (2012). Arsenic Trioxide Exerts Antimyeloma Effects by Inhibiting Activity in the Cytoplasmic Substrates of Histone Deacetylase 6. *Plos One* 7, e32215.
- Quezada, S.A., Jarvinen, L.Z., Lind, E.F., and Noelle, R.J. (2004). CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 307–328.

- Rahman, M.A., and Hasegawa, H. (2011). High levels of inorganic arsenic in rice in areas where arsenic-contaminated water is used for irrigation and cooking. *Sci. Total Environ.* 409, 4645–4655.
- Rahman, A., Vahter, M., Smith, A.H., Nermell, B., Yunus, M., El Arifeen, S., Persson, L.-A., and Ekström, E.-C. (2009). Arsenic exposure during pregnancy and size at birth: a prospective cohort study in Bangladesh. *Am. J. Epidemiol.* 169, 304–312.
- Rahman, A., Vahter, M., Ekström, E.-C., and Persson, L.-Å. (2010). Arsenic Exposure in Pregnancy Increases the Risk of Lower Respiratory Tract Infection and Diarrhea during Infancy in Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* 119, 719–724.
- Ramirez, T., Brocher, J., Stopper, H., and Hock, R. (2008). Sodium arsenite modulates histone acetylation, histone deacetylase activity and HMGN protein dynamics in human cells. *Chromosoma* 117, 147–157.
- Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T.W. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3410–3415.
- Rangasamy, T., Guo, J., Mitzner, W.A., Roman, J., Singh, A., Fryer, A.D., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Tuder, R.M., Georas, S.N., et al. (2005). Disruption of *Nrf2* enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J. Exp. Med.* 202, 47–59.
- Raqib, R., Ahmed, S., Sultana, R., Wagatsuma, Y., Mondal, D., Hoque, A.M.W., Nermell, B., Yunus, M., Roy, S., Persson, L.A., et al. (2009). Effects of in utero arsenic exposure on child immunity and morbidity in rural Bangladesh. *Toxicol. Lett.* 185, 197–202.
- Ratnaike, R.N. (2003). Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad. Med. J.* 79, 391–396.
- Reichard, J.F., Schneckenger, M., and Puga, A. (2007). Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 188–192.
- Relloso, M., Puig-Kröger, A., Pello, O.M., Rodríguez-Fernández, J.L., de la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Muñoz-Fernández, M.A., Sánchez-Mateos, P., and Corbí, A.L. (2002). DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 2634–2643.
- Rossmann, T.G., Uddin, A.N., and Burns, F.J. (2004). Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 394–404.
- Rushworth, S.A., Zaitseva, L., Murray, M.Y., Shah, N.M., Bowles, K.M., and MacEwan, D.J. (2012). The high *Nrf2* expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF-κB and underlies its chemo-resistance. *Blood* 120, 5188–5198.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., and Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 331–344.
- Safe, S., and Abdelrahim, M. (2005). Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 41, 2438–2448.
- Sakurai, T., Ohta, T., Tomita, N., Kojima, C., Hariya, Y., Mizukami, A., and Fujiwara, K. (2006). Evaluation of immunotoxic and immunodisruptive effects of inorganic arsenite on human monocytes/macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 6, 304–315.
- Salgado-Bustamante, M., Ortiz-Pérez, M.D., Calderón-Aranda, E., Estrada-Capetillo, L., Niño-Moreno, P., González-Amaro, R., and Portales-Pérez, D. (2010). Pattern of expression of apoptosis and inflammatory genes in humans exposed to arsenic and/or fluoride. *Sci. Total Environ.* 408, 760–767.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118.
- Santin, A.D., Hermonat, P.L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Cannon, M.J., Hiserodt, J.C., Pecorelli, S., and Parham, G.P. (1999). Expression of surface antigens during the differentiation

- of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes in vitro. *Immunobiology* 200, 187–204.
- Satthaporn, S., and Eremin, O. (2001). Dendritic cells (I): Biological functions. *J. R. Coll. Surg. Edinb.* 46, 9–19.
- Schuhmacher-Wolz, U., Dieter, H.H., Klein, D., and Schneider, K. (2009). Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of its carcinogenic and non-carcinogenic effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 39, 271–298.
- Schulz, H., Nagymajtényi, L., Institoris, L., Papp, A., and Siroki, O. (2002). A study on behavioral, neurotoxicological, and immunotoxicological effects of subchronic arsenic treatment in rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65, 1181–1193.
- Schumann, K., Lämmermann, T., Bruckner, M., Legler, D.F., Polleux, J., Spatz, J.P., Schuler, G., Förster, R., Lutz, M.B., Sorokin, L., et al. (2010). Immobilized Chemokine Fields and Soluble Chemokine Gradients Cooperatively Shape Migration Patterns of Dendritic Cells. *Immunity* 32, 703–713.
- Sengupta, M., and Bishayi, B. (2002). EFFECT OF LEAD AND ARSENIC ON MURINE MACROPHAGE RESPONSE. *Drug Chem. Toxicol.* 25, 459–472.
- Sengupta, S.R., Das, N.K., and Datta, P.K. (2008). Pathogenesis, clinical features and pathology of chronic arsenicosis. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 74, 559–570.
- Shen, Z.-X., Chen, G.-Q., Ni, J.-H., Li, X.-S., Xiong, S.-M., Qiu, Q.-Y., Zhu, J., Tang, W., Sun, G.-L., Yang, K.-Q., et al. (1997). Use of Arsenic Trioxide (As₂O₃) in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia (APL): II. Clinical Efficacy and Pharmacokinetics in Relapsed Patients. *Blood* 89, 3354–3360.
- Shi, Q., Xiong, Q., Le, X., and Xie, K. (2001). Regulation of interleukin-8 expression by tumor-associated stress factors. *J. Interf. Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interf. Cytokine Res.* 21, 553–566.
- Shim, M.J., Kim, H.J., Yang, S.J., Lee, I.S., Choi, H.I., and Kim, T. (2002). Arsenic trioxide induces apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells: possible involvement of p38 MAP kinase. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 377–383.
- Sikorski, E.E., McCay, J.A., White, K.L., Jr, Bradley, S.G., and Munson, A.E. (1989). Immunotoxicity of the semiconductor gallium arsenide in female B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* 13, 843–858.
- Sikorski, E.E., Burns, L.A., McCoy, K.L., Stern, M., and Munson, A.E. (1991). Suppression of splenic accessory cell function in mice exposed to gallium arsenide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110, 143–156.
- Simeonova, P.P., and Luster, M.I. (2004). Arsenic and atherosclerosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 444–449.
- Singer, M., Trugnan, G., and Chelbi-Alix, M.K. (2011). Arsenic trioxide reduces 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced murine colitis via nuclear factor-κB down-regulation and caspase-3 activation. *Innate Immun.* 17, 365–374.
- Smedley, P.L., and Kinniburgh, D.G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17, 517–568.
- Smith, A.H., Lingas, E.O., and Rahman, M. (2000). Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull. World Health Organ.* 78, 1093–1103.
- Smith, A.H., Marshall, G., Yuan, Y., Ferreccio, C., Liaw, J., von Ehrenstein, O., Steinmaus, C., Bates, M.N., and Selvin, S. (2006). Increased Mortality from Lung Cancer and Bronchiectasis in Young Adults after Exposure to Arsenic in Utero and in Early Childhood. *Environ. Health Perspect.* 114, 1293–1296.
- Smith, A.H., Marshall, G., Yuan, Y., Liaw, J., Ferreccio, C., and Steinmaus, C. (2011). Evidence From Chile That Arsenic in Drinking Water May Increase Mortality From Pulmonary Tuberculosis. *Am. J. Epidemiol.* 173, 414–420.

- Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C.M., and Kapsenberg, M.L. (1998). High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int. Immunol.* *10*, 1593–1598.
- Soto-Peña, G.A., and Vega, L. (2008). Arsenic interferes with the signaling transduction pathway of T cell receptor activation by increasing basal and induced phosphorylation of Lck and Fyn in spleen cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *230*, 216–226.
- Soto-Peña, G.A., Luna, A.L., Acosta-Saavedra, L., Conde, P., López-Carrillo, L., Cebrián, M.E., Bastida, M., Calderón-Aranda, E.S., and Vega, L. (2006). Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 779–781.
- Stancato, L.F., Hutchison, K.A., Chakraborti, P.K., Simons, S.S., Jr, and Pratt, W.B. (1993). Differential effects of the reversible thiol-reactive agents arsenite and methyl methanethiosulfonate on steroid binding by the glucocorticoid receptor. *Biochemistry (Mosc.)* *32*, 3729–3736.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* *137*, 1142–1162.
- Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 351–358.
- Strober, W., and Fuss, I.J. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* *140*, 1756–1767.
- Styblo, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R., and Thomas, D.J. (2000). Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch. Toxicol.* *74*, 289–299.
- Takahashi, M., Ota, A., Karnan, S., Hossain, E., Konishi, Y., Damdindorj, L., Konishi, H., Yokochi, T., Nitta, M., and Hosokawa, Y. (2013). Arsenic trioxide prevents nitric oxide production in lipopolysaccharide -stimulated RAW 264.7 by inhibiting a TRIF-dependent pathway. *Cancer Sci.* *104*, 165–170.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* *140*, 805–820.
- Tapio, S., and Grosche, B. (2006). Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat. Res.* *612*, 215–246.
- Tenorio, E.P., and Saavedra, R. (2005). Differential effect of sodium arsenite during the activation of human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* *5*, 1853–1869.
- Thimmulappa, R.K., Lee, H., Rangasamy, T., Reddy, S.P., Yamamoto, M., Kensler, T.W., and Biswal, S. (2006). Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J. Clin. Invest.* *116*, 984–995.
- Toxnet NLM (2001). Arsenic compounds
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 133–146.
- Tseng, W.P. (1977). Effects and dose--response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. *Environ. Health Perspect.* *19*, 109–119.
- Vahidnia, A., van der Voet, G.B., and de Wolff, F.A. (2007). Arsenic neurotoxicity--a review. *Hum. Exp. Toxicol.* *26*, 823–832.
- Vaknin-Dembinsky, A., Balashov, K., and Weiner, H.L. (2006). IL-23 Is Increased in Dendritic Cells in Multiple Sclerosis and Down-Regulation of IL-23 by Antisense Oligos Increases Dendritic Cell IL-10 Production. *J. Immunol.* *176*, 7768–7774.
- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.-D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal Lamina Propria Dendritic Cell Subsets Have Different Origin and Functions. *Immunity* *31*, 502–512.
- Vremec, D., Lieschke, G.J., Dunn, A.R., Robb, L., Metcalf, D., and Shortman, K. (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* *27*, 40–44.

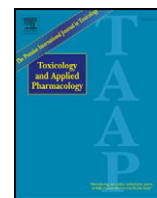
- Wang, X.-J., Sun, Z., Chen, W., Li, Y., Villeneuve, N.F., and Zhang, D.D. (2008). Activation of Nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1-Cul3 interaction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 383–389.
- Welch, A.H., Westjohn, D.B., Helsel, D.R., and Wanty, R.B., 2000, Arsenic in ground water of the United States-- occurrence and geochemistry: *Ground Water* v.38 no.4, p.589-604
- Wijeweera, J.B., Gandolfi, A.J., Parrish, A., and Lantz, R.C. (2001). Sodium arsenite enhances AP-1 and NFκB DNA binding and induces stress protein expression in precision-cut rat lung slices. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 61, 283–294.
- Williams, M.A., Rangasamy, T., Bauer, S.M., Killedar, S., Karp, M., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Breyse, P., Biswal, S., and Georas, S.N. (2008). Disruption of the transcription factor Nrf2 promotes pro-oxidative dendritic cells that stimulate Th2-like immunoresponsiveness upon activation by ambient particulate matter. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 4545–4559.
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431–1433.
- Wruck, C.J., Fragoulis, A., Gurzynski, A., Brandenburg, L.-O., Kan, Y.W., Chan, K., Hassenpflug, J., Freitag-Wolf, S., Varoga, D., Lippross, S., et al. (2011). Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 844–850.
- Wu, M.-M., Chiou, H.-Y., Ho, I.-C., Chen, C.-J., and Lee, T.-C. (2003). Gene expression of inflammatory molecules in circulating lymphocytes from arsenic-exposed human subjects. *Environ. Health Perspect.* 111, 1429–1438.
- Wu, W., Graves, L.M., Jaspers, I., Devlin, R.B., Reed, W., and Samet, J.M. (1999). Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *Am. J. Physiol.* 277, L924–931.
- Xie, K. (2001). Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 375–391.
- Yang, H.-C., Fu, H.-L., Lin, Y.-F., and Rosen, B.P. (2012). Pathways of arsenic uptake and efflux. *Curr. Top. Membr.* 69, 325–358.
- Yu, H.-S., Liao, W.-T., and Chai, C.-Y. (2006). Arsenic Carcinogenesis in the Skin. *J. Biomed. Sci.* 13, 657–666.
- Zhang, Z., Kytтарыs, V.C., and Tsokos, G.C. (2009). The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 3160–3169.
- Zheng, Y., Wu, J., Ng, J.C., Wang, G., and Lian, W. (2002). The absorption and excretion of fluoride and arsenic in humans. *Toxicol. Lett.* 133, 77–82.
- Zhou, L.J., and Tedder, T.F. (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 154, 3821–3835.
- Zhou, J., Wang, W., Wei, Q.-F., Feng, T.-M., Tan, L.-J., and Yang, B.-F. (2007). Effects of arsenic trioxide on voltage-dependent potassium channels and on cell proliferation of human multiple myeloma cells. *Chin. Med. J. (Engl.)* 120, 1266–1269.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445–489.
- Zhu, J., Jankovic, D., Oler, A.J., Wei, G., Sharma, S., Hu, G., Guo, L., Yagi, R., Yamane, H., Punkosdy, G., et al. (2012). The Transcription Factor T-bet Is Induced by Multiple Pathways and Prevents an Endogenous Th2 Cell Program during Th1 Cell Responses. *Immunity* 37, 660–673.
- Ziady, A.G., Sokolow, A., Shank, S., Corey, D., Myers, R., Plafker, S., and Kelley, T.J. (2012). Interaction with CREB binding protein modulates the activities of Nrf2 and NF-κB in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302, L1221–1231.
- Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 715–727.

Annexes

Principale publication

Inorganic arsenic impairs differentiation and functions of human dendritic cells

M. Macoch, C. Morzadec, O. Fardel, L. Vernhet, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013



Inorganic arsenic impairs differentiation and functions of human dendritic cells

Mélinda Macoch^a, Claudie Morzadec^a, Olivier Fardel^{a,b}, Laurent Vernhet^{a,*}

^a UMR INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France

^b Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2012

Revised 29 October 2012

Accepted 3 November 2012

Available online 16 November 2012

Keywords:

Arsenic
Dendritic cells
Differentiation
Interleukins

ABSTRACT

Experimental studies have demonstrated that the antileukemic trivalent inorganic arsenic prevents the development of severe pro-inflammatory diseases mediated by excessive Th1 and Th17 cell responses. Differentiation of Th1 and Th17 subsets is mainly regulated by interleukins (ILs) secreted from dendritic cells (DCs) and the ability of inorganic arsenic to impair interferon- γ and IL-17 secretion by interfering with the physiology of DCs is unknown. In the present study, we demonstrate that high concentrations of sodium arsenite (As(III), 1–2 μ M) clinically achievable in plasma of arsenic-treated patients, block differentiation of human peripheral blood monocytes into immature DCs (iDCs) by inducing their necrosis. Differentiation of monocytes in the presence of non-cytotoxic concentrations of As(III) (0.1 to 0.5 μ M) only slightly impacts endocytotic activity of iDCs or expression of co-stimulatory molecules in cells activated with lipopolysaccharide. However, this differentiation in the presence of As(III) strongly represses secretion of IL-12p70 and IL-23, two major regulators of Th1 and Th17 activities, from iDCs stimulated with different toll-like receptor (TLR) agonists in metalloid-free medium. Such As(III)-exposed DCs also exhibit reduced mRNA levels of IL12A and/or IL12B genes when activated with TLR agonists. Finally, differentiation of monocytes with non-cytotoxic concentrations of As(III) subsequently reduces the ability of activated DCs to stimulate the release of interferon- γ and IL-17 from Th cells. In conclusion, our results demonstrate that clinically relevant concentrations of inorganic arsenic markedly impair *in vitro* differentiation and functions of DCs, which may contribute to the putative beneficial effects of the metalloid towards inflammatory autoimmune diseases.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Trivalent inorganic arsenic (iAs) is an immunotoxic metalloid that promotes the development of chronic diseases in humans daily exposed during several years, notably through ingestion of contaminated drinking water (Schuhmacher-Wolz et al., 2009). However, when appropriately administrated during short cycle treatments, iAs is an efficient anticancer drug curing acute promyelocytic leukemia (APL) driven by the t(15:17) translocation. At well tolerable concentrations, iAs thus markedly increases survival of patients with relapsed or

refractory diseases, without inducing bone marrow suppression (Chen et al., 2011).

In this therapeutic context, recent experimental studies demonstrate that iAs can also efficiently prevent severe immune-related diseases in different murine models. Indeed, this metalloid was found to almost totally block lymphoproliferation and systemic lesions in MRL/lpr mice exhibiting a human lupus-like syndrome (Bobé et al., 2006). In addition, iAs prevents and cures inflammatory colitis in a chemically-induced mouse model of Crohn's disease (Singer et al., 2011) and markedly reduces murine sclerodermatous graft-versus-host disease (GVHD) by abrogating severe intestinal, vascular and skin clinical symptoms (Kavian et al., 2012). Among the numerous cell types involved in these inflammatory diseases, T helper (Th) lymphocytes play a central role by secreting an array of specific pro-inflammatory cytokines. Especially, interferon (INF)- γ and interleukin (IL)-17, produced by Th1 and Th17 cells respectively, greatly contribute to the development of systemic lupus erythematosus (SLE), inflammatory bowel disease (IBD) or GVHD in mice and humans (Dander et al., 2009; Doreau et al., 2009; Nishimori et al., 2012; Strober and Fuss, 2011; Zhang et al., 2009). Differentiation of Th cells into Th1 and Th17 subsets is strongly controlled by Th cell microenvironment and mainly by cytokines secreted from dendritic cells (DCs). Particularly, activated DCs release IL-12 which specifically stimulates Th1 polarization and Th1 immune responses. These

Abbreviations: iAs, inorganic arsenic; As(III), sodium arsenite; APL, acute promyelocytic leukemia; Th, T helper lymphocytes; IL, interleukin; IFN, interferon- γ ; GVHD, graft-versus-host disease; SLE, systemic lupus erythematosus; IBD, inflammatory bowel disease; DC, dendritic cells; iDCs, immature DCs; cMFI, corrected Mean Fluorescence Intensities; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; LPS, lipopolysaccharide; PI, propidium iodide; PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; RT-qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; mAb, monoclonal antibody; MLR, mixed leukocyte reactions; CFSE, carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester; FITC, Fluorescein isothiocyanate; PE, Phycoerythrin.

* Corresponding author at: Inserm U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France. Fax: +33 2 23 23 47 94.

E-mail address: laurent.vernhet@univ-rennes1.fr (L. Vernhet).

antigen presenting cells also produce IL-6 and IL-23 that are necessary for getting fully functional Th17 cells (Langrish et al., 2004).

It is interesting to point out that therapeutic efficiency of iAs, in these different murine models, is associated with a strong reduction of tissue concentrations of the pro-inflammatory cytokines produced by Th cells: iAs thus significantly decreases IFN- γ and IL-17 concentrations in MRL/lpr and IBD mice, respectively (Bobé et al., 2006; Singer et al., 2011); in addition, IL-17 levels produced *ex vivo* by splenocytes, isolated from iAs-exposed mice, are significantly lower than those released by cells isolated from control GVHD mice (Kavian et al., 2012). It is now well demonstrated that iAs can directly affect *in vitro* and *ex vivo* physiology of human T cells (Galicia et al., 2003; Morzadec et al., 2012; Soto-pena et al., 2006). Particularly, we recently reported that iAs almost totally inhibits the expression of IL-17A by blocking *in vitro* differentiation of human Th17 cells (Morzadec et al., 2012). Conversely, we showed that the metalloid cannot directly prevent the generation of Th1 cells and the massive production of IFN- γ produced by fully differentiated Th1 cells. The possibility that the metalloid may indirectly affect the secretion of IFN- γ and IL-17 by interfering with DC functions remains however totally unknown. This hypothesis should deserve attention since previous results, obtained in murine models, indicate that tissue levels of IL-12 and IL-23 in mice treated with iAs are significantly lower than those measured in control animals developing IBD and/or a lupus-like syndrome (Bobé et al., 2006; Singer et al., 2011).

The present study has thus been designed to investigate the effects of sodium arsenite (As(III)), a trivalent arsenical salt, on differentiation and functions of human DCs derived from peripheral blood monocytes. Our results demonstrate that high micromolar concentrations (1 to 2 μ M), corresponding to plasmatic iAs levels detected in APL patients treated with this metalloid (Shen et al., 1997), reduce the viability of immature DCs (iDCs). Moreover, differentiation of DCs in the presence of non-cytotoxic concentrations of As(III) (<1 μ M) i) strongly impairs IL-12p70 and IL-23 expressions in DCs stimulated with different TLR agonists or with a cocktail of pro-inflammatory cytokines, in a metalloid-free medium and ii) reduces the ability of human activated DCs to subsequently stimulate IFN- γ and IL-17 secretion from human allogeneic Th cell cultures. Such iAs-mediated alterations of DC physiology are likely to contribute to the immunological effects of this metalloid, especially in the context of inflammatory immune diseases.

Materials and methods

Chemicals and reagents. As(III), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), ionomycin, propidium iodide (PI), Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran and lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* 055:B5) were purchased from Sigma-Aldrich. Human recombinant IL-4 was from Miltenyi Biotec and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) was provided by Shering Plough. IFN- γ , IL-1 β , TNF- α and IL-6 were from Peprotech. R848 and zymosan were purchased from Invivogen.

DC generation and T cell culture. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from blood buffy coats of healthy donors (provided by Etablissement Français du Sang, Rennes, France) through Ficoll gradient centrifugation. Human monocytes were isolated from PBMCs by positive selection using a magnetic separator QuadroMACS (Miltenyi Biotec) and micromagnetic beads coated with a monoclonal antibody (mAb) directed against CD14 (Miltenyi Biotec). After washings, monocytes were seeded in 6-well plates at a concentration of 500,000 cells/mL in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), 100 IU/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco). To generate iDCs, monocytes were cultured with 500 IU/mL GM-CSF and 50 ng/mL IL-4, in the absence or presence of indicated concentrations of As(III), for 6 days, at

37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. iDCs were then washed with RPMI, in order to remove As(III) from culture medium. After counting and seeding 500,000 cells/mL, iDCs were stimulated for 24 h with LPS (25 ng/mL), R848 (3 μ g/mL) or zymosan (10 μ g/mL), in the absence or presence of IFN- γ (50 ng/mL), to get mature DCs. For T cells, after isolation of PBMCs and separation of monocytes by a 1-h adhesion step, Th cells were purified from non-adherent cells by negative selection using the Dynabeads Untouched human CD4 + T cell kit (Invitrogen). After washings, cells were cultured in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin.

Cell number and viability. Cells were counted manually by optical microscopy. Viability was quantified by the Trypan blue exclusion assay and by the analysis of intracellular PI staining using a FC500 flow cytometer and a CXP Analysis software (Beckman Coulter).

Immunolabeling by flow cytometry. Phenotypic analysis of DCs was performed by direct immunofluorescence using flow cytometry. Cells were first blocked in PBS supplemented with 5% fetal calf serum for 20 min to avoid non-specific binding, resuspended in 30 μ l PBS and then incubated with specific mAb or appropriate isotypic controls. After 30 min, cells were washed and analyzed by flow cytometry (10,000 events per sample), using a FC500 flow cytometer. The following mAbs were used: Phycoerythrin (PE)-conjugated mouse monoclonal Ab against CD14 (Miltenyi Biotec) or FITC-conjugated mouse monoclonal Abs against DC-SIGN (Miltenyi Biotec), CD1a, CD80, CD83 or CD86 (BD Bioscience). Corrected Mean Fluorescence Intensities (cMFI) were calculated by subtracting values of isotypic control MFI from those of absolute MFI.

Endocytotic activity. 500,000 iDCs/mL were incubated with 1 mg/ml FITC-dextran wt 40,000 for 60 min at 37 °C. Cellular uptake of FITC-dextran was then monitored by flow cytometry. A negative control was performed in parallel by incubating cells with FITC-dextran at 4 °C instead of 37 °C. Uptake of FITC-dextran was expressed as cMFI calculated by subtracting MFI measured for uptake at 4 °C from that measured for uptake at 37 °C, and as % of positive cells, i.e., % positive cells (uptake at 37 °C) – % positive cells (uptake at 4 °C).

Quantification of cytokine levels. Levels of IL-6, IL-12p40, IL-12p70, IL-17, IL-23 and IFN- γ , secreted in culture medium were quantified by ELISA, using specific DuoSet ELISA development system kits following the manufacturer's instructions (R&D Systems).

RNA isolation and RT-PCR assays. Total RNAs were extracted by the TRIzol method (Invitrogen) and then analyzed by RT-PCR using the fluorescent dye SYBR Green methodology and an ABI Prism 7300 detector (Applied Biosystem), as previously described (Morzadec et al., 2012). Specific gene primer sets were from Qiagen. Specificity of gene amplification was checked up at the end of PCR through analysis of dissociation curves of the PCR products. Amplification curves were analyzed by the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA to an 18S RNA endogenous reference.

MLR. The ability of DCs to stimulate activity of human allogeneic CD4 + T cells in MLR was assessed by measuring cell division and cytokine secretion. Before MLR, DCs were first differentiated with or without 0.25 μ M As(III) for 6 days, and then non-stimulated (iDCs) or stimulated with 25 ng/ml LPS in a As(III)-free medium for 48 h to obtain mature DCs. To determine cell division, Th cells were labeled with 0.25 μ M carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes) for 10 min at 37 °C, washed and rested for 1 h. Cells were then cultured in the absence or presence of iDCs or

stimulated DCs for 5 days; cell division was determined by analyzing CFSE dilution on a F500 flow cytometer. The % of dividing cells was calculated by measuring the % of cells that display MFI at least twice lower than that of non-dividing cells.

For cytokine secretions, after 5 days of culture, cells were washed and stimulated with 20 ng/mL PMA and 1 μ M ionomycin during 24 h. Then, cytokines released in culture medium were quantified by ELISA as described above.

Statistical analysis. Data are expressed as mean \pm SD. Significant differences were evaluated using Student's *t*-test or ANOVA followed

by the multi-range Dunnett's *t* test when multiple comparisons were studied. Criterion of significance of the difference between means was $p < 0.05$.

Results

As(III) represses expression of phenotypic surface markers of iDCs

We first investigated the effects of micromolar concentrations of As(III) (0.1 to 2 μ M), corresponding to iAs plasmatic levels achievable in APL patients (Shen et al., 1997), on relative expression of

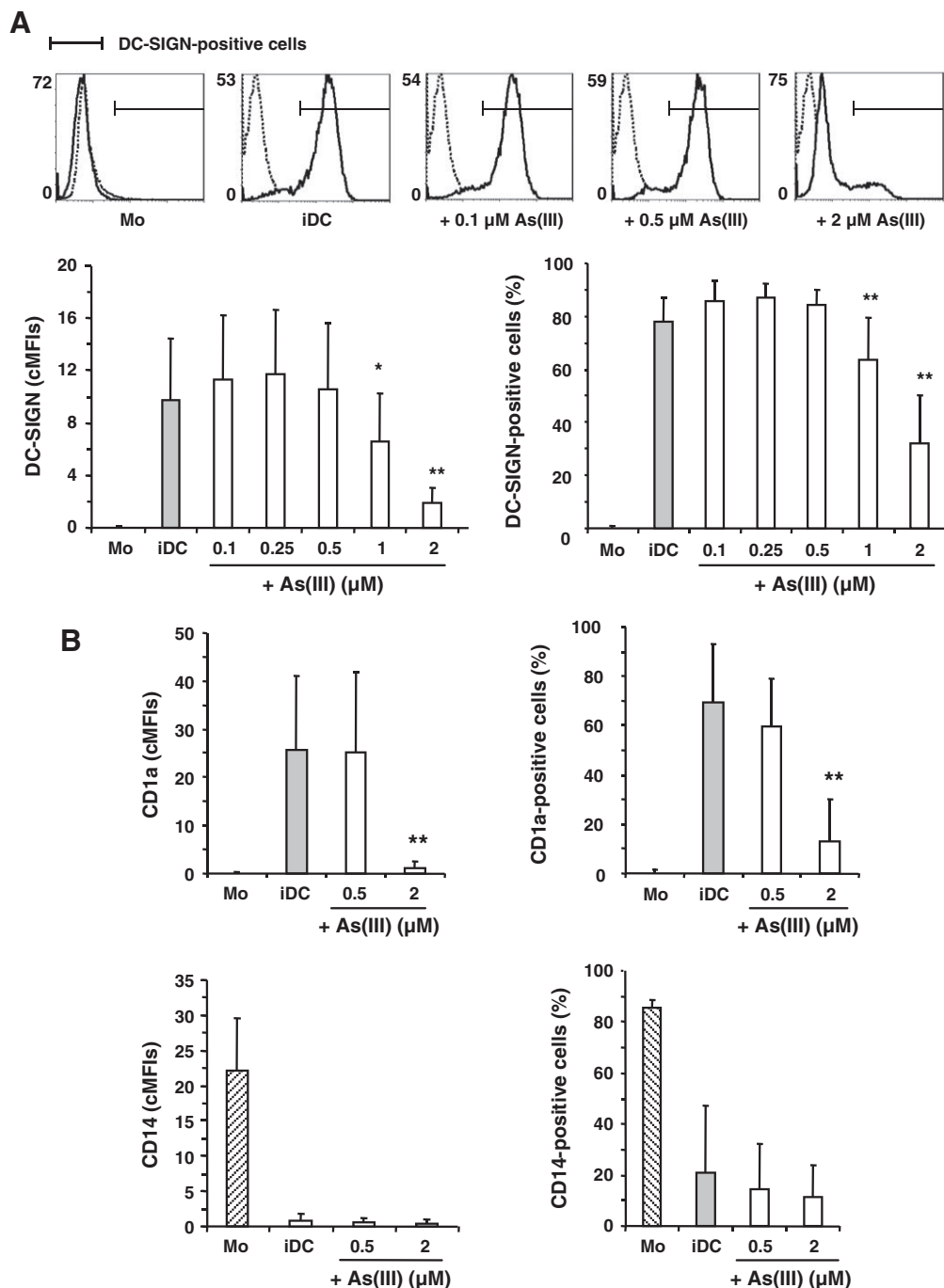


Fig. 1. As(III) reduces membrane expression of the differentiation markers DC-SIGN and CD1a. Human peripheral blood monocytes (Mo) were differentiated into iDCs with GM-CSF and IL-4 for 6 days, in the absence or presence of increasing concentrations of As(III). Membrane expression of DC-SIGN (A), CD1a (B) and CD14 (B) were then analyzed by flow cytometry (10,000 events per sample), using the CXP analysis software. Representative graphs saved during flow cytometry analysis of DC-SIGN staining are displayed on the top of panel A. Results are expressed as means \pm SD of 8 (A) and 6 (B) independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus untreated iDCs. cMFI (corrected Mean Fluorescence Intensities) were calculated by subtracting values of isotopic control MFI from those of absolute MFI.

phenotypic surface markers, such as DC-SIGN and CD1a, which classically characterize differentiated iDCs. Human blood peripheral monocytes were differentiated into iDCs by a 6-day treatment with IL-4 and GM-CSF, in the absence or presence of increasing concentrations of As(III); the metalloid was added once in the culture medium at day 0. Fig. 1A shows that As(III) concentrations higher than 0.5 μ M significantly decreases DC-SIGN expression which is potentially induced in control iDCs when compared to that measured in monocytes. Expression of DC-SIGN, which promotes adhesion to T cells and subsequent T cell activity (Geijtenbeek et al., 2000), is reduced by 32% and 80% in iDCs differentiated with 1 and 2 μ M As(III), respectively. In addition, 2 μ M As(III) also significantly prevents the induction of CD1a expression (Sallusto and Lanzavecchia, 1994), whereas, at 0.5 μ M, the metalloid has no effect (Fig. 1B). Such decreased expressions of DC-SIGN and CD1a could likely result either from a global blockage of monocyte differentiation into DCs or from direct cytotoxic effects of the metalloid. In order to discriminate between these hypotheses, we next analyzed expression of CD14 which is highly expressed in peripheral blood

monocytes and down-regulated in iDCs (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Fig. 1C clearly indicates that As(III) could not prevent repression of CD14 expression; the metalloid is thus unlikely to specifically counteract monocyte differentiation.

As(III) decreases viability of iDCs at high concentrations

At 1 μ M and 2 μ M, As(III) significantly decreases the number of iDCs recovered after 6 days of culture (Fig. 2A, left graph). In addition, using the trypan blue exclusion assay, we show that these two concentrations also reduce the viability of iDCs by approximately 38–40% (Fig. 2B, right graph). To confirm cytotoxic metalloid effects, we quantified cell necrosis by measuring DNA binding of PI, using flow cytometry. Fig. 2B indicates that only the two highest concentrations of As(III), i.e. 1 and 2 μ M, significantly increase the percentage of PI-positive iDCs. It can be noted that, as observed with the trypan blue exclusion assay, about 40% of necrotic PI-positive cells are detected among iDCs differentiated in the presence of 2 μ M As(III).

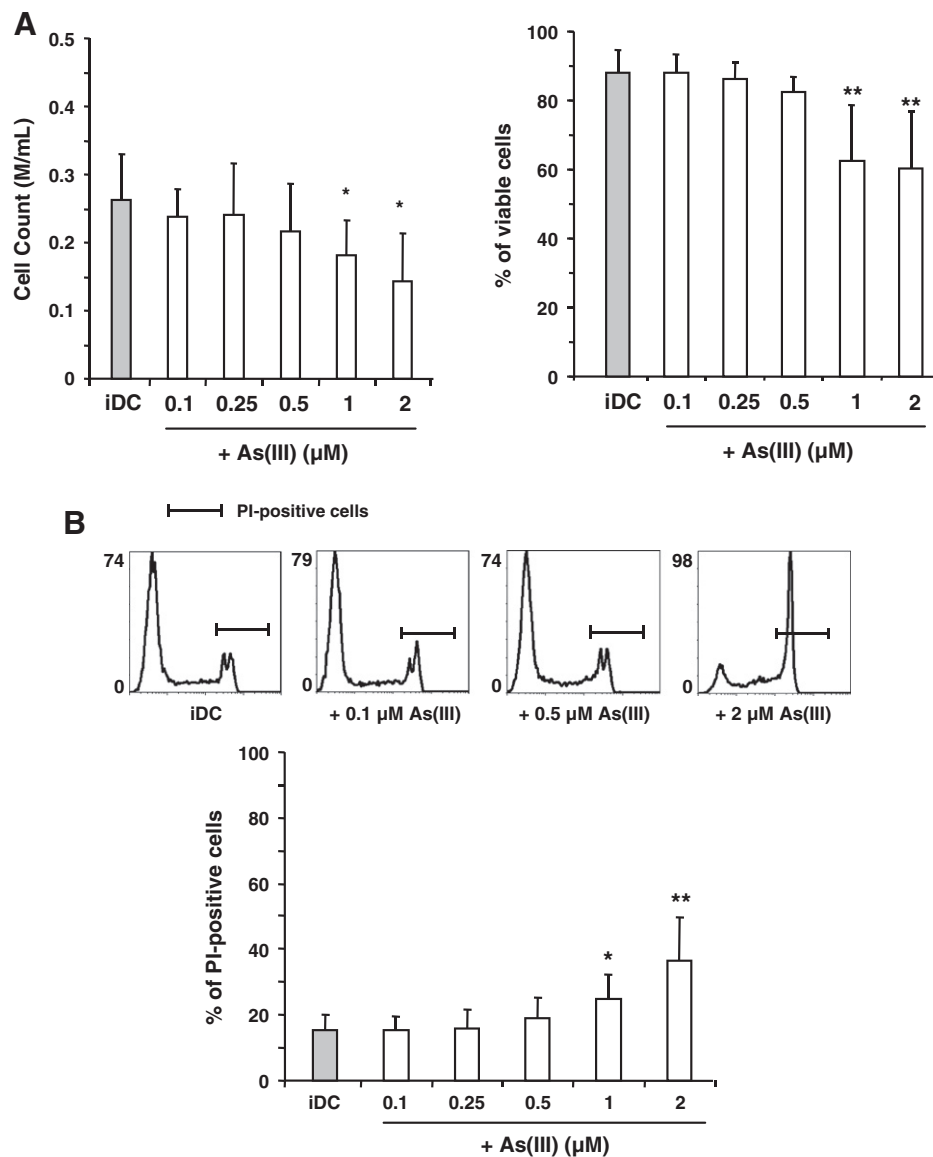


Fig. 2. High concentrations of As(III) alter iDC viability. Monocytes were differentiated into iDCs for 6 days, in the absence or presence of increasing concentrations of As(III). In (A), the total number of cells recovered at day 6 was manually counted by microscopy (left graph) and the percentages of viable cells were determined by trypan blue assay (right graph). In (B), cell viability was analyzed by flow cytometry using PI staining. Representative graphs saved during flow cytometry analysis are displayed at the top of panel B. Results are expressed as means \pm SD of 6 independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01 versus untreated iDCs.

Non-cytotoxic concentrations of As(III) weakly alter iDC endocytotic activity

We next determined whether non-cytotoxic concentrations of As(III), i.e. 0.1 to 0.5 μM , can alter endocytotic activity, a major function of iDCs. Endocytotic activity was analyzed by quantifying the uptake of FITC-dextran by iDCs. As shown in Fig. 3, only iDCs differentiated in the presence of 0.5 μM As(III) display a reduced cMFI, which reflects a decreased intracellular concentration of FITC-dextran. However, no concentration of As(III) can affect the percentage of FITC-dextran-positive cells.

iDC differentiation in the presence of As(III) slightly reduces the expression of co-stimulatory molecules in mature DCs

To obtain mature DCs, iDCs, differentiated in the absence or presence of non-cytotoxic concentrations of As(III), were then stimulated with LPS, a well-known TLR4 agonist, in a metalloid-free medium for 24 h. Maturation of iDCs is notably characterized by up-regulated expressions of different phenotypic surface markers, such as CD83 or the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 (Fig. S1). Differentiation of iDC in the presence of 0.1–0.5 μM As(III) has no or only modest effects on LPS-induced expression of these markers. Indeed, as shown in Fig. 4, only 0.5 μM As(III) weakly, although significantly, decreases expression of CD80 and CD86; however As(III) cannot modify the percentage of mature DCs positive for these markers.

As(III) markedly reduces the expression of IL-12p70 and IL-23 in DCs stimulated with LPS, in the absence or presence of IFN- γ

Another hallmark of DCs is their capacity to secrete great amounts of several ILs in response to TLR stimulation. We thus compared the ability of control iDCs and iDCs differentiated in the presence of 0.1–0.5 μM As(III) to secrete different ILs when stimulated for 24 h with LPS, in an As(III)-free culture medium. Fig. 5A demonstrates that As(III) treatment dose-dependently decreases the release of IL-12p40, IL-12p70, IL-23 and IL-6 in culture medium of activated DCs, knowing that IL-12p40 associates with IL-12p35 or IL-12p19 to generate the active secreted forms of IL-12p70 and IL-23, respectively (Lyakh et al., 2008). At 0.1 μM , As(III) significantly reduces, by approximately 50%, the secretion of IL-12p70, a potent Th1 polarizing cytokine, whereas 0.25 μM As(III) decreases the secretion of IL-12p40 and IL-12p70 by 55% and 70%, respectively; at 0.25 μM , As(III) also markedly represses the secretion of IL-23 and IL-6, which both contribute to the polarization of human Th17 cells (Langrish et al., 2004; Strober and Fuss, 2011), by

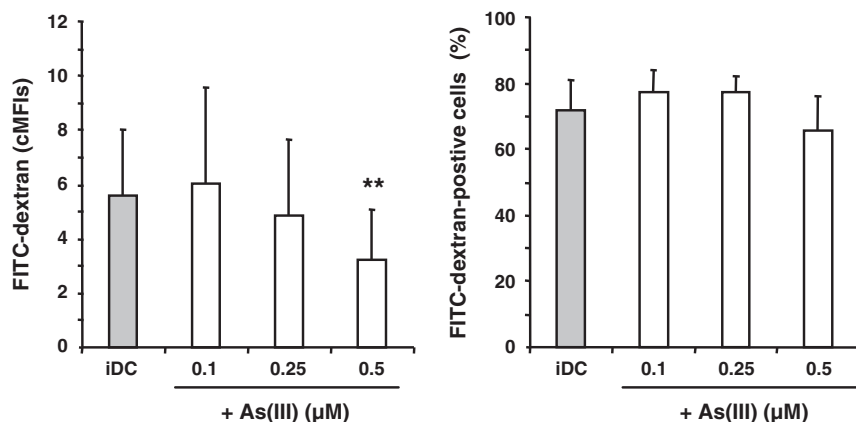


Fig. 3. As(III) slightly decreases endocytotic activity of iDCs. Human peripheral blood monocytes were differentiated into iDCs by GM-CSF and IL-4 for 6 days, in the absence or presence of non-cytotoxic concentrations of As(III). Then, iDC were washed and incubated with 1 mg/mL FITC-dextran (wt 40 000) at 37 °C or 4 °C for negative controls. Cellular uptake of FITC-dextran was then assessed by flow cytometry (10,000 events per sample), using the CXP analysis software. Uptake of FITC-dextran is expressed as corrected mean fluorescence intensity (cMFI) calculated by subtracting MFI measured at 4 °C from that measured for uptake at 37 °C (left graph), and as % of positive cells (uptake at 37 °C) – % positive cells (uptake at 4 °C) (right graph). Results are expressed as means \pm SD of 4 independent experiments. ** $p < 0.01$ compared with untreated iDCs.

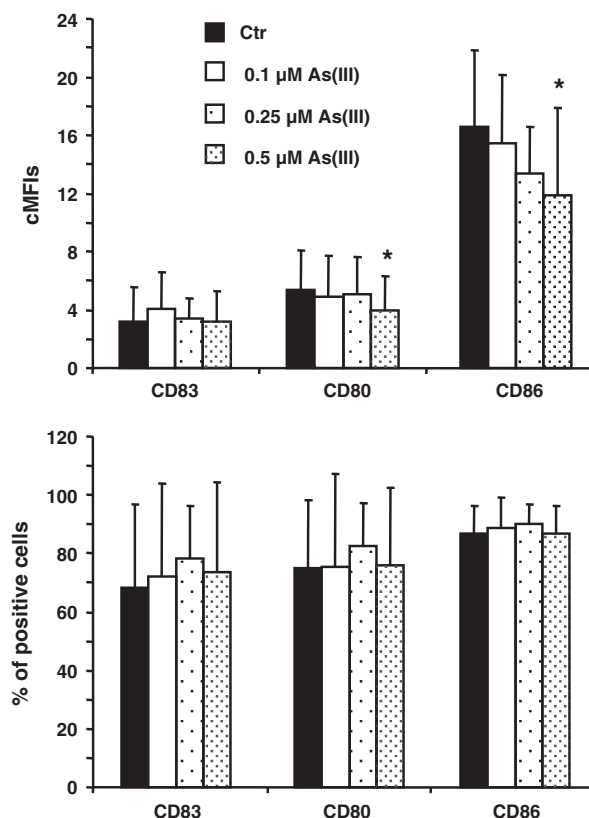


Fig. 4. As(III) slightly reduces membrane expression of CD80 and CD86 co-stimulatory molecules. Monocytes were differentiated into iDCs for 6 days, in the absence (Ctr) or presence of non-cytotoxic concentrations of As(III). Then, iDCs were washed and activated with LPS (25 ng/mL) for 24 h. Membrane expression of CD80, CD83 and CD86 was analyzed by flow cytometry (10,000 events per sample), using the CXP analysis software. Results are expressed as means \pm SD of 6 independent experiments. * $p < 0.05$, versus Ctr.

86% and 53%, respectively. Combined stimulation of iDCs with LPS and IFN γ is known to greatly enhance cytokine expression (Lyakh et al., 2008). As expected, we observed that the amounts of IL-12p70 and IL-23 secreted by LPS/IFN- γ -stimulated DCs are 8.8 and 3.5 fold higher, respectively, than those produced by their LPS-stimulated counterparts (Fig. 5B). Interestingly, inhibitory effects of 0.1 μM As(III), towards the secretion of IL-12p70 and IL-23, are more potent on these fully activated

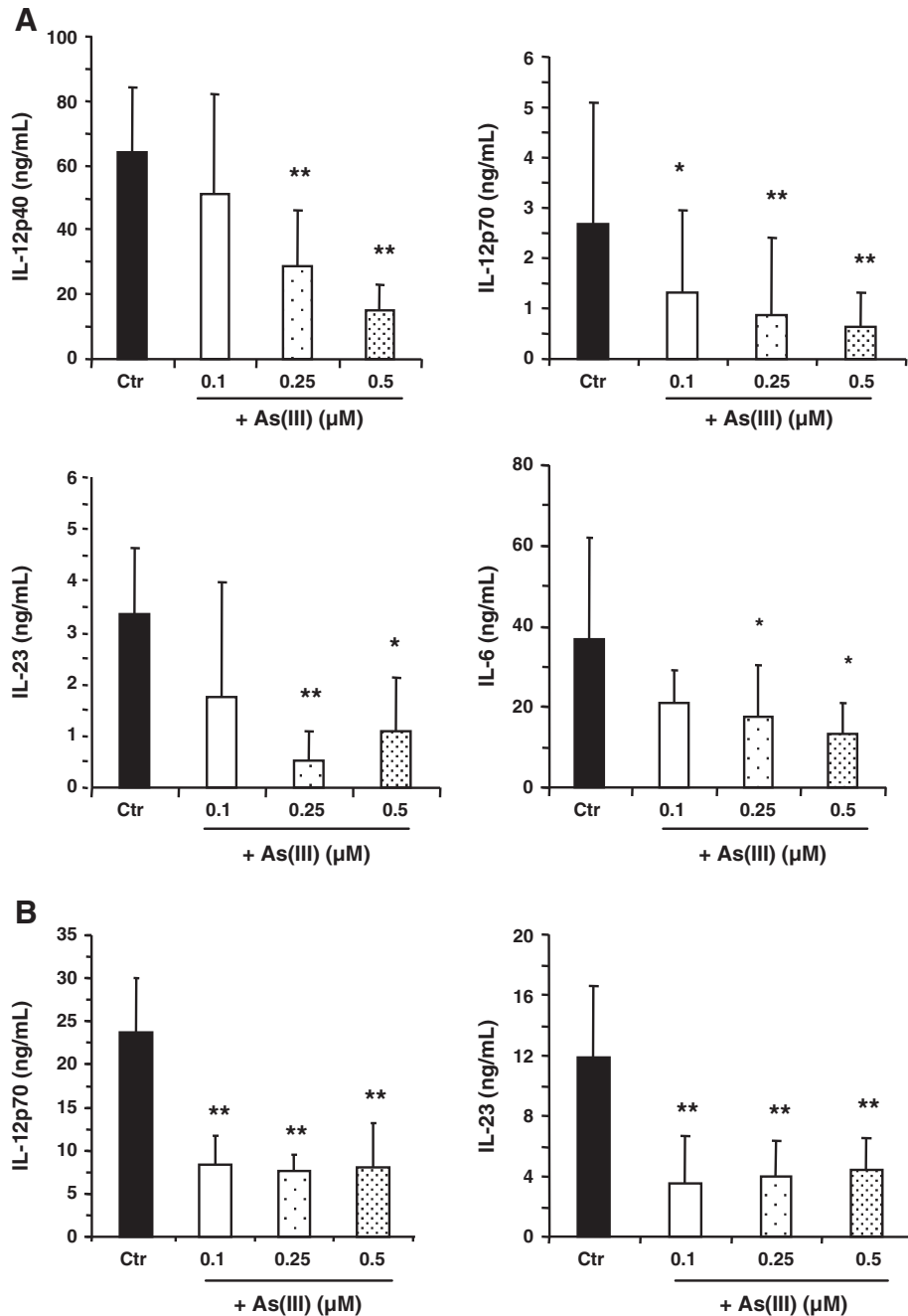


Fig. 5. As(III) inhibits the secretion of IL-12p40, IL-12p70, IL-23 and IL-6 from DCs stimulated with LPS. Monocytes were differentiated into iDCs for 6 days, in the absence (Ctr) or presence of non-cytotoxic concentrations of As(III). Then, iDCs were washed and stimulated with LPS (25 ng/mL) (A) or with LPS (25 ng/mL) + IFN-γ (50 ng/mL) (B) for 24 h, in a metalloid-free medium. Levels of IL-12p40, IL-12p70, IL-23 and IL-6 in culture medium of activated DCs were measured by ELISA. Results are expressed as means \pm SD of 8 (IL-12p40), 10 (IL-12p70), 5 (IL-23), 7 (IL-6) (A) and 3 (IL-12p70, IL-23) (B) independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus Ctr.

DCs than those observed on DCs stimulated with LPS alone; indeed, at 0.1 μ M, the metalloid reduces by 65% and 70% the respective release of IL-12p70 and IL-23 from LPS/IFN-γ-stimulated DCs.

Expression of IL-12p19, IL-12p35 and IL-12p40 subunits are coded by IL23A, IL12A and IL12B genes, respectively. Stimulation of iDCs with LPS for 6 h markedly induces mRNA expression of these 3 genes (Fig. S2). Differentiation of iDCs in the presence of 0.25 μ M As(III) significantly reduces both IL12A and IL12B mRNA levels in activated DCs (Fig. 6A); however, it does not modify IL23A mRNA levels but decreases those of IL6 gene. Besides ILs, various chemokines such as CXCL10 and CXCL11, which promote migratory activity of Th1 cells, exhibit increased expression in response to LPS (Fig. S2). Fig. 6B shows that, in contrast to its effects on ILs, 0.25 μ M As(III) slightly strengthens up-regulation of CXCL10,

CXCL11 and CCL22 gene expression in activated DCs; in addition, the metalloid has no effect on mRNA levels of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1), a key intracellular enzyme in immune regulation.

As(III) significantly reduces cytokine expression induced by TLR7/8 and TLR2 agonists

We next investigated the effects of As(III) on IL expression induced by the stimulation of DCs with other TLRs. Fig. 7A shows that 0.25 μ M As(III) significantly decreases the secretion of IL-12p70 induced by R848, a potent TLR7/8 agonist (Gerosa et al., 2008), in the absence or presence of IFN-γ. It also markedly reduces that of IL-23 up-regulated by R848 alone. The combined stimulation of iDCs with

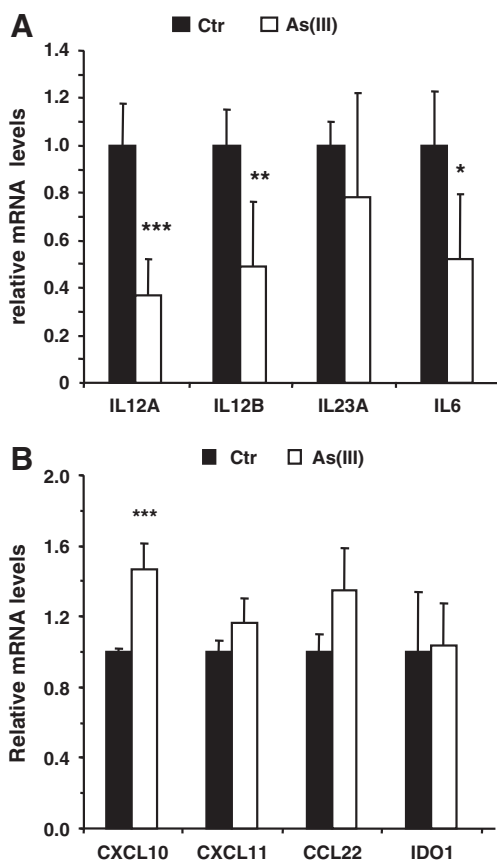


Fig. 6. As(III) specifically represses induction of IL-12A, IL-12B and IL-6 mRNA levels in iDCs stimulated with LPS. Monocytes were differentiated into iDCs for 6 days, in the absence (Ctrl) or presence of 0.25 μ M As(III). Then, iDCs were washed and stimulated with LPS (25 ng/mL) for 6 h in a metalloid-free medium. Total RNAs were isolated and mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are presented relatively to mRNA levels found in control DCs stimulated with LPS, arbitrary set at the value of 1. Results are expressed as means \pm SD of 5 (A) and 4 (B) independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus Ctrl.

R848 and IFN- γ produced however a lower release of IL-23 than that measured in cells stimulated with R848 alone; As(III) slightly and not significantly reduces IL-23 secretion from these co-stimulated DCs. Fig. 7A also indicates that, as expected, stimulation of iDCs with zymosan, a TLR2 agonist, does not trigger IL-12p70 release but markedly induces that of IL-23 (Gerosa et al., 2008). However, when co-stimulated with zymosan and IFN- γ , DCs strongly release both ILs. Differentiation of iDCs with 0.25 μ M As(III) significantly reduces these productions of IL-12p70 and IL-23 in cells co-stimulated with zymosan and IFN- γ (Fig. 7A). Finally, besides TLR stimulation, we show that exposure of iDCs to As(III) during their differentiation also reduces the ability of DCs to secrete IL-12p70 and IL-23 when the cells are co-stimulated with a mixture of IL-6, IL1- β and TNF- α that reflects an inflammatory microenvironment (Fig. S3). Inhibitory effects of As(III) on IL secretion is associated with a reduction of IL12A, IL12B and IL23A mRNA levels in DCs stimulated with R848 and IFN- γ (Fig. 7B); however, As(III) only prevents the up-regulation of IL12A mRNA levels in DCs stimulated with zymosan and IFN- γ .

Differentiation of iDCs with As(III) impairs the ability of activated DCs to trigger cytokine secretion from human Th cells

Our results demonstrate that differentiation of iDCs in the presence of As(III) markedly affects the phenotype of mature DCs and notably their ability to secrete ILs. Since IL-12p70, IL-23 and IL-6 greatly contribute to the regulation of Th cell physiology, we further compared the ability of DCs, differentiated in the absence or presence of

the metalloid, to activate T cell functions. To this goal, control iDCs, and iDCs differentiated in the presence of 0.25 μ M As(III), were next stimulated with LPS for 48 h in a metalloid-free medium and then co-cultured with human Th cells for 5 days. Fig. 8A indicates that increasing concentrations of activated DCs markedly stimulate division of Th cells in co-cultures. However, the fact that iDCs were first exposed to As(III) does not alter the subsequent capacity of stimulated DCs to trigger T cell division. Co-culture of Th cells for 5 days with stimulated DCs, but not with iDCs, also strongly increases the secretion of IFN- γ and IL-17 from T cells re-stimulated with PMA and ionomycin for 24 h (Fig. 8B). Interestingly, the levels of IFN- γ released from activated T cells, are significantly lower when activated DCs are first exposed to 0.25 μ M As(III) during their differentiation. Metalloid exposure also markedly reduces, although not significantly, the secretion of IL-17A from re-stimulated T cells.

Discussion

We demonstrate in the present study that high concentrations (1–2 μ M) of As(III) impair *in vitro* viability of human DCs whereas lower non-cytotoxic concentrations of the metalloid potentially reduce the ability of DCs to both secrete key ILs and stimulate T cell activity.

Our results clearly indicate that As(III) concentrations above 1 μ M block *in vitro* differentiation of human DCs by inducing cytotoxic effects. As(III) may trigger DC necrosis by inhibiting GM-CSF-dependent survival pathways. Indeed, this growth factor markedly increases viability of monocytes, macrophages and DCs by up-regulating expression of anti-apoptotic genes regulated through JAK/STAT-, PI3K/AKT- or NF- κ B-dependent signalling pathways (Conti et al., 2008). Interestingly, we previously demonstrated that similar concentrations of iAs prevent GM-CSF-dependent differentiation of human peripheral blood monocytes into functional macrophages through down-regulation of NF- κ B-induced expression of the antiapoptotic X-linked inhibitor of apoptosis protein and FLICE-inhibitory protein genes (Lemarie et al., 2006). Since DCs were differentiated with a cocktail containing GM-CSF, it may be hypothesized that As(III) can counteract similar survival pathways in our DC model.

Differentiation of DCs in the presence of non-cytotoxic concentrations of As(III) (0.1 to 0.5 μ M) strongly impairs the secretion of key ILs from activated DCs. Our results demonstrate that As(III) dose-dependently inhibits the LPS-induced release of IL-12p70 and IL-23. In addition, the metalloid blocks secretion of these two ILs from DCs stimulated, not only, with two other different TLR agonists (R848 and zymosan), but also with a mixture of pro-inflammatory cytokines (TNF- α /IL-1 β /IL-6). The ability of metalloid to repress IL secretion thus most likely represents a general effect on DC physiology that is independent of the cell activation pattern. Moreover, this effects seems rather specific since, at 0.25 μ M, As(III) does not i) prevent induction of DC-SIGN and CD1a expression in iDCs, ii) impair endocytotic activity and co-stimulatory molecules expression in iDCs and mature DCs, respectively and iii) block LPS-dependent expression of the chemokines CXCL10, CXCL11 and CCL22 or that of IDO.

The molecular mechanisms by which As(III) inhibits IL-12p70 and IL-23 secretion appear however complex and different according to the cytokine. Human IL-12p70 is a heterodimeric cytokine comprising of covalently linked p35 and p40 subunits which are encoded by IL12A and IL12B genes, respectively. As(III) potentially down-regulates IL12A mRNA levels in DCs stimulated with LPS, R848 or zymosan. This effect probably contributes, in a major way, to As(III)-dependent inhibition of IL-12p70 release because IL12A expression, and the resulting p35 production, are limiting steps for cytokine processing (Langrish et al., 2004). Induction of IL12A gene expression in LPS-stimulated DCs is controlled by signalling pathways mainly involving MAPK and NF- κ B activation (Kollet and Petro, 2006; Yang et al., 2012). In our hands, As(III) was unable to prevent LPS-induced phosphorylation of ERK, p38-kinase or JNK, and to block the

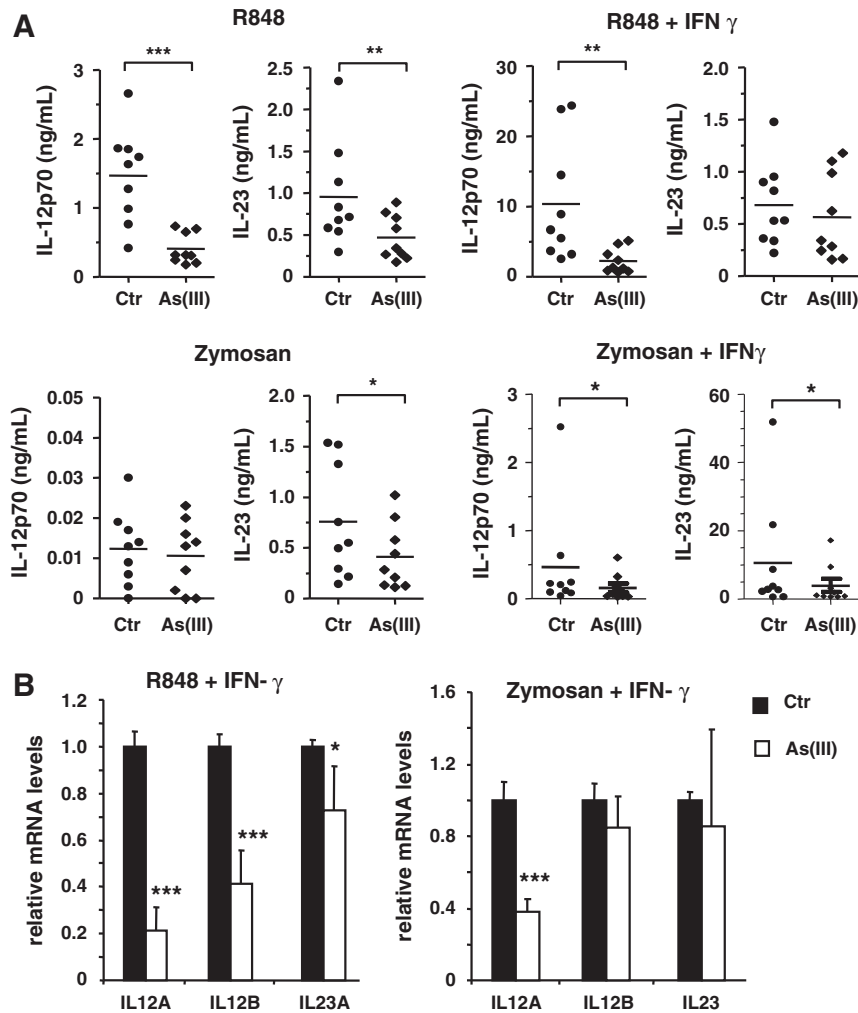


Fig. 7. As(III) reduces the secretion of IL-12p70 and IL-23 from iDCs stimulated with TLR7/8 and TLR2 agonists. Monocytes were differentiated into iDCs for 6 days, in the absence (Ctr) or presence of 0.25 μ M As(III). Then, after washings, iDCs were stimulated with R848 (3 μ g/mL) or zymosan (10 μ g/mL), in the absence or presence of IFN- γ (50 ng/mL), for 6 h (B) or 24 h (A), in a metalloid-free medium. In (A), levels of IL-12p40, IL-12p70, IL-23 and IL-6 in culture medium were measured by ELISA. In (B), total RNAs were isolated and mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are presented relatively to mRNA levels found in control DCs stimulated with R848 or zymosan, arbitrary set at the value of 1. Results are expressed as means \pm SD of 9 (A) and 5 (B) independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus Ctr.

degradation of I κ B α , the specific inhibitor of NF- κ B p65 subunit (data not shown). The metalloid may thus impair more downstream biochemical events such as p65 transcriptional activity. IL-23 is also a heterodimer which links p40 and p19 subunits. IL23A gene encodes p19, and its expression is critical for IL-23 synthesis. Our results indicate that As(III) does not alter IL23A mRNA levels in LPS- or zymosan-activated DCs and that it only slightly reduces them in R848-stimulated DCs. Both IL12B expression and IL-12p40 secretion are significantly reduced in DCs first differentiated in the presence of As(III) and then activated with LPS. However, these inhibitions can only marginally impact total IL-23 synthesis because the amounts of p40 produced by activated DCs, first exposed to As(III) during their differentiation, remain always higher than those of IL-23 produced by control DCs stimulated with LPS, alone or in association with IFN- γ . Molecular mechanisms controlling the inhibition of IL-23 secretion are thus not initiated by a default in p40 or p19 expression, but may be related to a post-transductional event such as a defect in IL-23 processing or trafficking in As(III)-exposed DCs.

The main function of mature DCs is to activate T cells by direct physical interactions and/or production of specific ILs. Interestingly, our results demonstrate that differentiation of monocytes into iDCs, in the presence of 0.25 μ M As(III), subsequently reduces the ability of mature DCs to stimulate the secretion of IFN- γ and IL-17 from

human Th cells co-cultured in a metalloid-free medium. These reduced levels of IFN- γ and IL-17 do not result from a global reduction of the number of Th cells since As(III) does not impair Th cell division in MLRs. In addition, at 0.25 μ M, the metalloid does not prevent CD80/CD86 expression which triggers co-stimulatory signals and optimal secretion of cytokines from Th cells directly interacting with mature DCs. In contrast, the lower capacity of Th cells to secrete cytokines may result from the decreased production of IL-12p70 and IL-23 in As(III)-pre-treated DCs stimulated with LPS since these two master regulators of adaptive immunity specifically stimulate IFN- γ and IL-17 expression in Th cells, respectively (Langrish et al., 2004).

The demonstration, in the present study, that As(III) deeply alters, at least *in vitro*, the phenotype of human mature DCs and their ability to activate Th cells, may be taken into account when considering the putative therapeutic effects of the metalloid towards immune-mediated diseases, because DCs and some DC-derived cytokines greatly contribute to the development of these diseases. First, inactivation of host antigen presenting cells or DCs alone is in fact an efficient strategy to prevent GVHD induced by allogeneic bone marrow transplantation (Duffner et al., 2004; Shlomchik et al., 1999). Secondly, IL-12 can initiate Th1-mediated inflammatory responses, and the blockage of its expression or actions can limit IBD or SLE severity (Kikawada et al., 2003; Mannon et al., 2004).

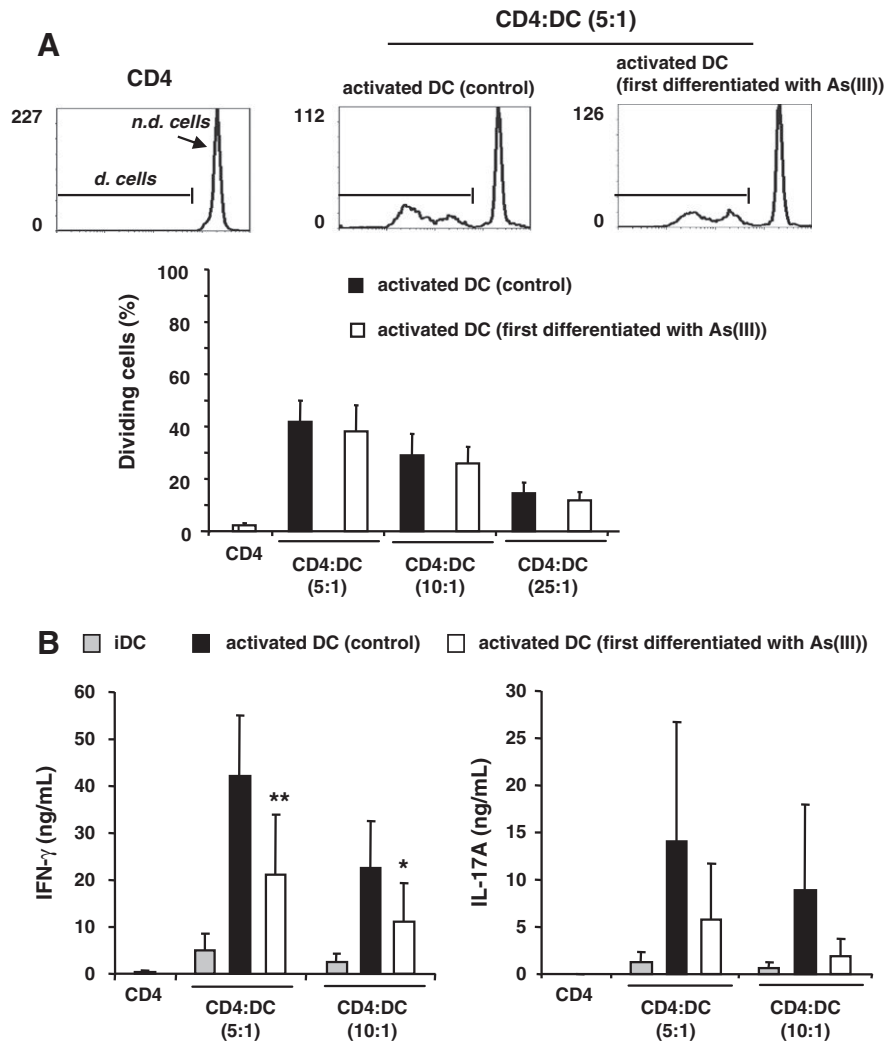


Fig. 8. Exposure of DCs to As(III) during their differentiation impairs the ability of activated DCs to stimulate IFN- γ and IL-17 secretion from human Th cells. Monocytes were differentiated into iDCs for 6 days, in the absence or presence of 0.25 μ M As(III). Then, iDCs were washed and stimulated with LPS (25 ng/mL) for 24 h in a metalloid-free medium. Human Th cells were next co-cultured in the absence or presence of decreasing concentrations of iDCs or activated DCs for 5 days. In (A), Th cell proliferation was analyzed by flow cytometry using CFSE dilutions. Representative graphs saved during flow cytometry analysis are displayed at the top panel. In (B), Th cells were washed and re-stimulated with PMA (20 ng/mL) and ionomycin (1 μ M) for 24 h. Levels of IFN- γ and IL-17 in culture medium were measured by ELISA. Results are expressed as means \pm SD of 5 (A and B) independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 versus control activated DCs. d: dividing cells; n.d.: non-dividing cells.

Particularly, treatment with a monoclonal Ab against IL-12 reduces clinical symptoms and induces remission in patients with Crohn's disease (Mannon et al., 2004). Curative effects of the Ab are associated with a marked reduction of IFN- γ secretion from mononuclear cells of the colonic lamina propria of these patients. In this therapeutic context, iAs has been recently reported to inhibit colon inflammation symptoms in the murine trinitrobenzene sulfonic acid-induced model of IBD and to almost totally block the induction of IL-12 mRNA levels, in colon extracts (Singer et al., 2011); unfortunately, the study does not indicate whether iAs also reduces the levels of IFN- γ , which promotes the initial phase of IBD (Strober and Fuss, 2011). This possibility is however supported by the fact that As(III) reduces IFN- γ expression by repressing IL-12p70 secretion from mature DCs, in the present study. This point is interesting to consider since we recently demonstrated that the metalloid is unable to directly block *in vitro* secretion of IFN- γ from human Th1 cells (Morzadec et al., 2012). Third, IL-23 also strongly contributes to the development of SLE (Kytaridis et al., 2010), Crohn's disease (Neurath, 2007) and GVHD (Das et al., 2010), mainly by stimulating the differentiation of Th17 cells that secrete large amounts of IL-17. Expression of IL-17 and IL-23 receptor in double-negative T cells of MRP/lpr mice increases as the

disease progressively worsens, and this active IL-23/IL-17 axis greatly favours development of nephritis in these SLE-prone mice (Zhang et al., 2009). Transplantation of IL-23 deficient marrow grafts, or administration of an Ab directed against IL-23, significantly prevent the production of pro-inflammatory cytokines (including IL-17), specifically reduce the pathologic damages in the colon microenvironment, and increase animal survival in a murine model of GVHD (Das et al., 2009, 2010). IL-23 is also highly expressed in inflamed mucosa of patients suffering from IBD and blockage of its production markedly decreases Th17 cell infiltration, inflammatory responses and cytotoxicity (Liu et al., 2011). Our present results suggest that As(III) can indirectly reduce IL-17 production, likely by repressing IL-23 and IL-6 production in activated DCs. In addition, we have recently demonstrated that As(III) can also directly inhibit secretion of IL-17A by inhibiting *in vitro* differentiation of human Th17 cells. These mechanisms may also operate *in vivo* in a physiopathological context since iAs totally prevents induction of both IL-23 and IL-17 genes in mice suffering from IBD (Singer et al., 2011).

In conclusion, our present and previous results demonstrate that iAs can potentially reduce expression of IFN- γ and IL-17, two major pro-inflammatory cytokines heavily involved in the development of SLE, IBD or GVHD, by impairing the physiology of human DCs and

Th cells. Moreover, we show that such effects of the metalloid occur at low micromolar concentrations achievable in plasma of APL patients treated with iAs (Shen et al., 1997). However, due to its chronic toxicity, iAs is unlikely to be used for the treatment of patients suffering from SLE or IBD. Indeed, whereas APL patients are efficiently cured with short term exposures to iAs, treatment of these chronic immune-related diseases requires long term exposure to anti-inflammatory or immunosuppressive drugs. It should be kept in mind that long term exposure to iAs is associated with several toxic effects including cancers (Schuhmacher-Wolz et al., 2009). Identification of the molecular mechanisms by which low doses of iAs potentially reduce cytokine expression in human activated DCs and Th cells may nevertheless lay the groundwork for the development of more safety anti-inflammatory drugs than this metalloid.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Les Comités Départementaux de la Ligue Contre le Cancer du Grand Ouest (Comités 35, 29, 44) and from Institut National du Cancer (INCa).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.11.008>.

References

- Bobé, P., Bonardelle, D., Benihoud, K., Opolon, P., Chelbi-Alix, M.K., 2006. Arsenic trioxide: a promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice. *Blood* 108, 3967–3975.
- Chen, S.J., Zhou, G.B., Zhang, X.W., Mao, J.H., de The, H., Chen, Z., 2011. From an old remedy to a magic bullet: molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of arsenic in fighting leukemia. *Blood* 117, 6425–6437.
- Conti, L., Cardone, M., Varano, B., Puddu, P., Belardelli, F., Gessani, S., 2008. Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 38, 750–762.
- Dander, E., Balduzzi, A., Zappa, G., Lucchini, G., Perseghin, P., Andre, V., Todisco, E., Rahal, D., Migliauacca, M., Longoni, D., Solinas, G., Villa, A., Berti, E., Mina, P.D., Parma, M., Allavena, P., Biagi, E., Rovelli, A., Biondi, A., D'Amico, G., 2009. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 88, 1261–1272.
- Das, R., Chen, X., Komorowski, R., Hessner, J., Drobyski, W.R., 2009. Interleukin-23 secretion by donor antigen-presenting cells is critical for organ-specific pathology in graft-versus-host-disease. *Blood* 113, 2352–2362.
- Das, R., Komorowski, R., Hessner, M.J., Subramanian, H., Huettner, C.S., Cua, D., Drobyski, W.R., 2010. Blockade of interleukin-23 signaling results in targeted protection of the colon and allows for separation of graft-versus-host and graft-versus-leukemia responses. *Blood* 115, 5249–5258.
- Doreau, A., Belot, A., Bastid, J., Riche, B., Trescol-Biemont, M.C., Ranchin, B., Fabien, N., Cochat, P., Pouteil-Noble, C., Trolliet, P., Durieu, I., Tebib, J., Kassai, B., Ansieau, S., Puisieux, A., Eliaou, J.F., Bonnefoy-Bérard, N., 2009. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* 10, 778–785.
- Duffner, U.A., Maeda, Y., Cooke, K.R., Reddy, P., Ordemann, R., Liu, C., Ferrara, J.L., Teshima, T., 2004. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J. Immunol.* 172, 7393–7398.
- Galicía, G., Leyva, R., Tenorio, E.P., Ostrosky-Wegman, P., Saavedra, R., 2003. Sodium arsenite retards proliferation of PHA-activated T cells by delaying the production and secretion of IL-2. *Int. Immunopharmacol.* 3, 671–682.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575–585.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L.A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R.T., Consolaro, M.R., De Marchi, M., Giachino, D., Robbiano, A., Astegiano, M., Sambataro, A., Kastelein, R.A., Carra, G., Trinchieri, G., 2008. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 1447–1461.
- Kavian, N., Marut, W., Servettaz, A., Laude, H., Nicco, C., Chéreau, C., Weill, B., Batteux, F., 2012. Arsenic trioxide prevents murine sclerodermatous graft-versus-host disease. *J. Immunol.* <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1103538>.
- Kikawada, E., Lenda, D.M., Kelley, V.R., 2003. IL-12 deficiency in MRL-Fas(lpr) mice delays nephritis and intrarenal IFN-gamma expression, and diminishes systemic pathology. *J. Immunol.* 170, 3915–3925.
- Kollet, J.L., Petro, T.M., 2006. IRF-1 and NF- κ B p50/cRel bind to distinct regions of the proximal murine IL-12 p35 promoter during costimulation with IFN-gamma and LPS. *Mol. Immunol.* 43, 623–633.
- Kyrtaris, V.C., Zhang, Z., Kuchroo, V.K., Oukka, M., Tsokos, G.C., 2010. Cutting edge: IL-23 receptor deficiency prevents the development of lupus nephritis in C57BL/6-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* 184.
- Langrish, C.L., McKenzie, B.S., Wilson, N.J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2004. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 202, 96–105.
- Lemarie, A., Morzadec, C., Merino, D., Micheau, O., Fardel, O., Vernhet, L., 2006. Arsenic trioxide induces apoptosis of human monocytes during macrophagic differentiation through nuclear factor- κ B-related survival pathway down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 304–314.
- Liu, Z., Yadav, P.K., Xu, X., Su, J., Chen, C., Tang, M., Lin, H., Yu, J., Qian, J., Yang, P.C., Wang, X., 2011. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J. Leukoc. Biol.* 89, 597–606.
- Lyakh, L., Trinchieri, G., Provezza, L., Carra, G., Gerosa, F., 2008. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. *Immunol. Rev.* 226, 112–131.
- Mannon, P.J., Fuss, I.J., Mayer, L., Elson, C.O., Sandborn, W.J., Present, D., Dolin, B., Goodman, N., Groden, C., Hornung, R.L., Quezada, M., Yang, Z., Neurath, M.F., Salfeld, J., Veldman, G.M., Schwertschlag, U., Strober, W., Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group, 2004. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 2069–2079.
- Morzadec, C., Macoch, M., Robineau, M., Sparfel, L., Fardel, O., Vernhet, L., 2012. Inorganic arsenic represses interleukin-17A expression in human activated Th17 lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262, 217–222.
- Neurath, M.F., 2007. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat. Med.* 13, 26–28.
- Nishimori, H., Maeda, Y., Teshima, T., Sugiyama, H., Kobayashi, K., Yamasuji, Y., Kadohisa, S., Kadohisa, S., Uryu, H., Takeuchi, K., Tanaka, T., Yoshino, T., Iwakura, Y., Tanimoto, M., 2012. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* 119, 285–295.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118.
- Schuhmacher-Wolz, U., Dieter, H.H., Klein, D., Schneider, K., 2009. Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of its carcinogenic and non-carcinogenic effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 39, 271–298.
- Shen, Z.X., Chen, G.Q., Ni, J.H., Li, X.S., Xiong, S.M., Qiu, Q.Y., Zhu, Z., Tang, W., Sun, G.L., Yang, K.Q., Chen, Y., Zhou, L., Fang, Z.W., Wang, Y.T., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Chen, S.J., Chen, Z., Wang, Z.Y., 1997. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 89, 3354–3360.
- Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., Emerson, S.G., 1999. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285, 412–415.
- Singer, M., Trugnan, G., Chelbi-Alix, M.K., 2011. Arsenic trioxide reduces 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced murine colitis via nuclear factor- κ B down-regulation and caspase-3 activation. *Innate Immun.* 17, 365–374.
- Soto-Pena, G.A., Luna, A.L., Acosta-Saavedra, L., Conde, P., Lopez-Carrillo, L., Cebrian, M.E., Bastida, M., Calderon-Aranda, E.S., Vega, L., 2006. Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *FASEB J.* 20, 779–781.
- Strober, W., Fuss, I.J., 2011. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1756–1767.
- Yang, H.T., Papoutsopoulou, S., Belich, M., Brender, C., Janzen, J., Gantke, T., Handley, M., Ley, S.C., 2012. Coordinate regulation of TPL-2 and NF- κ B signaling in macrophages by NF- κ B p105. *Mol. Cell. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00564-12>.
- Zhang, Z., Kyrtaris, V.C., Tsokos, G.C., 2009. The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis. *J. Immunol.* 183, 3160–3169.

Contribution à d'autres projets de l'équipe

Inorganic arsenic represses interleukin-17A expression in human activated Th17 lymphocytes

C. Morzadec, M. Macoch, M. Robineau, L. Sparfel, O. Fardel, L. Vernhet,
Toxicology and Applied Pharmacology, 2012

Inorganic arsenic impairs proliferation and cytokine expression in human primary T lymphocytes

C. Morzadec, F. Bouezzedine, M. Macoch, O. Fardel, L. Vernhet, *Toxicology*, 2012



High Impact Short Article

Inorganic arsenic represses interleukin-17A expression in human activated Th17 lymphocytes

Claudie Morzadec^a, Mélinda Macoch^a, Marc Robineau^a, Lydie Sparfel^a,
Olivier Fardel^{a,b}, Laurent Vernhet^{a,*}

^a UMR INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France

^b Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2012

Accepted 7 May 2012

Available online 19 May 2012

Keywords:

Inorganic arsenic

IL-17A

Human Th17 lymphocytes

Inflammatory diseases

ABSTRACT

Trivalent inorganic arsenic [As(III)] is an efficient anticancer agent used to treat patients suffering from acute promyelocytic leukemia. Recently, experimental studies have clearly demonstrated that this metalloid can also cure lymphoproliferative and/or pro-inflammatory syndromes in different murine models of chronic immune-mediated diseases. T helper (Th) 1 and Th17 lymphocytes play a central role in development of these diseases, in mice and humans, especially by secreting the potent pro-inflammatory cytokine interferon- γ and IL-17A, respectively. As(III) impairs basic functions of human T cells but its ability to modulate secretion of pro-inflammatory cytokines by differentiated Th lymphocytes is unknown. In the present study, we demonstrate that As(III), used at concentrations clinically achievable in plasma of patients, has no effect on the secretion of interferon- γ from Th1 cells but almost totally blocks the expression and the release of IL-17A from human Th17 lymphocytes co-stimulated for five days with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, in the presence of differentiating cytokines. In addition, As(III) specifically reduces mRNA levels of the retinoic-related orphan receptor (ROR) γ C gene which encodes ROR γ t, a key transcription factor controlling optimal IL-17 expression in fully differentiated Th17 cells. The metalloid also blocks initial expression of IL-17 gene induced by the co-stimulation, probably in part by impairing activation of the JNK/c-Jun pathway. In conclusion, our results demonstrate that As(III) represses expression of the major pro-inflammatory cytokine IL-17A produced by human Th17 lymphocytes, thus strengthening the idea that As(III) may be useful to treat inflammatory immune-mediated diseases in humans.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Inorganic arsenic is a major environmental toxicant to which millions of individuals are exposed mainly through ingestion of contaminated drinking water (Chen et al., 2009). Paradoxically, trivalent inorganic arsenic (As(III)), is also an efficient anticancer agent used to treat patients with acute promyelocytic leukemia (APL) driven by the t(15;17) translocation (Chen et al., 2011). This metalloid markedly increases survival of APL patients, notably those with relapsed or refractory diseases. At low micromolar concentrations, As(III) promotes differentiation of APL cells by inducing degradation of the promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α oncoprotein generated by t(15;17) (Jeanne et al., 2010). Besides APL, experimental studies have recently revealed that As(III) also cures

different immune-mediated diseases in mice. First, As(III) has been found to successfully block, at well tolerable concentrations, lymphoproliferative and inflammatory autoimmune syndromes in MLR/*lrp* mice (Bobé et al., 2006). It also markedly reduces inflammatory bowel disease in a chemically-induced murine model of colitis (Singer et al., 2011) and it significantly prevents scleroderma and visceral lesions in a murine model of graft-versus-host disease (Kavian et al., 2012). Abnormal activation of murine T lymphocytes plays a central role in the development of these diseases, especially by producing deleterious amounts of pro-inflammatory cytokines such as interferon- γ (IFN- γ), interleukin-(IL-) 17A or IL-21 (Hou et al., 2011; Kappel et al., 2009; Leppkes et al., 2009). In mice, therapeutic efficiency of As(III) notably results from its ability to inhibit lymphoproliferation and to reduce tissue concentrations of pro-inflammatory cytokines (Bobé et al., 2006; Singer et al., 2011; Kavian et al., 2012).

Interestingly, clinical and toxicological studies have demonstrated that human T lymphocytes can also constitute critical targets of As(III). Indeed, decreased *ex-vivo* proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and secretion of IL-2 are significantly associated with increased metalloid concentrations in urines of environmentally exposed individuals (Biswas et al., 2008; Soto-pena et al., 2006). Similar

Abbreviations: As(III), trivalent inorganic arsenic; APL, acute promyelocytic leukemia; Abs, antibodies; aCD3/aCD28, Abs directed against CD3 and CD28; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; IL, interleukin; IFN- γ , interferon- γ ; Th, T helper lymphocytes; RORC, retinoic-related orphan receptor; PMA, phorbol myristate acetate; RT-qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; TGF, tumor growth factor; AhR, aryl hydrocarbon receptor.

* Corresponding author. Fax: +33 2 23 23 47 94.

E-mail address: laurent.vernhet@univ-rennes1.fr (L. Vernhet).

alterations of T lymphocyte functions are observed with human PBMCs exposed *in vitro* to the metalloid (Galicia et al., 2003). Moreover, we have recently reported that As(III) alters expression of several immune and stress genes in activated primary human T lymphocytes (Martin-Chouly et al., 2011). Once activated, CD4+ T helper (Th) lymphocytes (Th cells) can differentiate into different subtypes that produce large amounts of specific cytokines (Zhu and Paul, 2010). Notably, Th1 and Th17 cells preferentially secrete IFN- γ and IL-17, respectively. Although As(III) can clearly affect basic functions of human T cells, its impact on the production of pro-inflammatory cytokines by Th cells remains unknown. This point should however deserve attention since Th1 and/or Th17 cells are critically involved in the development of autoimmune and graft-versus-host diseases in humans (Damsker et al., 2011; Broady et al., 2010; Zhao et al., 2011).

In the present study, we demonstrated that, *in vitro*, low micromolar concentrations of As(III), in the range of those achievable in plasma of APL patients, do not alter secretion of IFN- γ by human Th1 cells but almost totally inhibit expression and secretion of IL-17A by human naive and memory Th17 cells. As(III) represses up-regulation of retinoic-related orphan receptor C (RORC) and IL-21 genes which both greatly contribute to IL-17A expression in fully differentiated Th17 cells (Manel et al., 2008; Yang et al., 2008). Finally, we found that the metalloid also blocks initial expressions of IL-17A and IL-21 genes induced by T cell co-stimulation may be through impairment of the JNK/c-Jun signaling pathway.

Materials and methods

Chemical reagents and Abs. As(III), phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin were from Sigma-Aldrich. Human recombinant cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 and tumor growth factor β (TGF β)) and neutralizing antibodies (Abs) against human IL-4 and IFN- γ were from R and D System. FITC-conjugated Abs were obtained from BD Biosciences.

Isolation and culture of human Th cells. PBMCs were isolated from blood buffy coats of healthy donors through Ficoll gradient centrifugation. After separation of monocytes by a 1-h adhesion step, Th cells were purified from non adherent cells by negative selection using Dynabeads T cell kits specific for human CD4+ cells (Invitrogen). Naïve and memory CD4+ cells were sorted by flow cytometry using a FACSAria cytometer (BD Biosciences); for this, total CD4+ cells were stained either with FITC-conjugated CD45RA Ab or with CD45RO Ab to sort naïve (CD4+CD45+) or memory (CD4+CD45RO+) cells, respectively. Cells were then cultured in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Cells were activated with Dynabeads coated with Abs directed against CD3 and CD28 antigens (aCD3/aCD28) (one bead per cell). For differentiation experiments, Th cells were activated with aCD3/aCD28 for 5 days in the absence (Th0) or presence of appropriate cytokines and neutralizing Abs. For Th1 cell differentiation, cells were treated with IL-12 (5 ng/ml) and Ab against IL-4 (10 μ g/ml). For Th17 differentiation, cells were treated with IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-23 (20 ng/ml), TGF β (5 ng/ml) and Abs against IFN- γ (10 μ g/ml) and IL-4 (10 μ g/ml).

Cell number and viability. Cells were counted manually by optical microscopy. Viability was determined using the Trypan blue exclusion assay.

Total RNA isolation and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Total RNAs were extracted by the TRIzol method (Invitrogen) and then analyzed by RT-qPCR using the fluorescent dye SYBR Green methodology and an ABI Prism 7300 detector (Applied Biosystem), as previously described (Martin-Chouly et al., 2011). Specific gene primer sets were from Qiagen. Relative quantification of the

steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA to a 18 S RNA endogenous reference.

Quantification of cytokine levels. Levels of IL-2, IL-17A, IL-22 and IFN- γ secreted in culture medium were quantified by ELISA using specific DuoSet ELISA development system kits (R&D Systems).

Western blot analysis. Cells were harvested and lysed on ice with lysis buffer as previously described (Lemarie et al., 2006). Then, lysates were sonicated on ice and protein concentration was quantified using the Bradford's method. Samples were analyzed by 10% SDS-PAGE, and then electroblotted overnight onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). After blocking, membranes were hybridized with primary Abs overnight at 4 °C and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary Abs. Immunolabelled proteins were visualized by chemiluminescence.

Statistical analysis. All independent experiments were repeated at least four times with similar results. Data are expressed as means \pm SD. Significant differences were evaluated using the Student *t*-test or the multi-range Dunnett's *t* test when multiple comparisons were studied. Criterion of significance of the difference between means was *p* < 0.05.

Results

As(III) inhibits IL-17A expression in human activated Th cells

We first investigate the effects of low micromolar concentrations of As(III), corresponding to arsenic plasmatic levels achievable in APL patients (Shen et al., 1997), on the secretion of IL-2, IFN- γ and IL-17A from Th0, Th1 and Th17 cells. Cells were pre-treated with 2 μ M As(III) for 2 h and then activated with aCD3/aCD28 for 5 days in the absence (for Th0 cells) or presence of the adequate cocktail of cytokines and Abs (for Th1 and Th17 cells); As(III) was added once and maintained in the culture medium during the 5 days. As expected, our results demonstrate that As(III) significantly decreases IL-2 secretion from Th0 cells but also from Th1 and Th17 cells (Fig. 1A). The metalloid does not alter the levels of IFN- γ secreted by Th0 and Th1 cells. However, it strongly reduces the potent secretion of IL-17A from Th17 cells and totally blocks the small amounts of this cytokine produced by Th0 and Th1 cells (Fig. 1A). In some experiments, after 5 days of culture, Th0, control Th17, and Th17 cells first pre-treated for 2 h with As(III) before differentiation (also named As-Th17 cells), were washed and re-stimulated for 24 h with PMA and ionomycin, in As(III)-free medium. Fig. 1B demonstrates that As-Th17 cells still release lower levels of IL-17A during a second round of stimulation when compared with those secreted by control Th17 cells. In addition, treatment of control Th17 cells with As(III), at day 5, also decreases the secretion of IL-17A in all cell cultures after a second round of stimulation (Fig. 1C). Th cells contain a mix of naïve and memory cells. We thus determined whether As(III) similarly inhibits IL-17A secretion from the two cell types. As previously demonstrated, we found that naïve Th0 cells do not release IL-17A when co-stimulated with aCD3/aCD28 alone (Chen et al., 2007). Pre-treatment of naïve and memory Th cells with As(III) for 2 h before their differentiation into Th17 cells almost totally blocks IL-17A secretion from the two cell types (Fig. 1D).

As(III) inhibits cytokine secretion at low concentrations and independently of cell cytotoxicity

As(III)-dependent inhibition of IL-17A secretion is concentration-dependent and significant for a dose as low as 0.25 μ M (Table 1). It is noteworthy that 0.25 μ M As(III) inhibits the release of IL-17A by 45% after 5 days of differentiation. At concentrations \geq 0.25 μ M, As(III) also significantly reduces the secretion of IL-2 and that of IL-22, a cytokine highly co-produced with IL-17A in Th17 cells (Table 1). At these concentrations, As(III) reduces significantly neither the percentage of viable

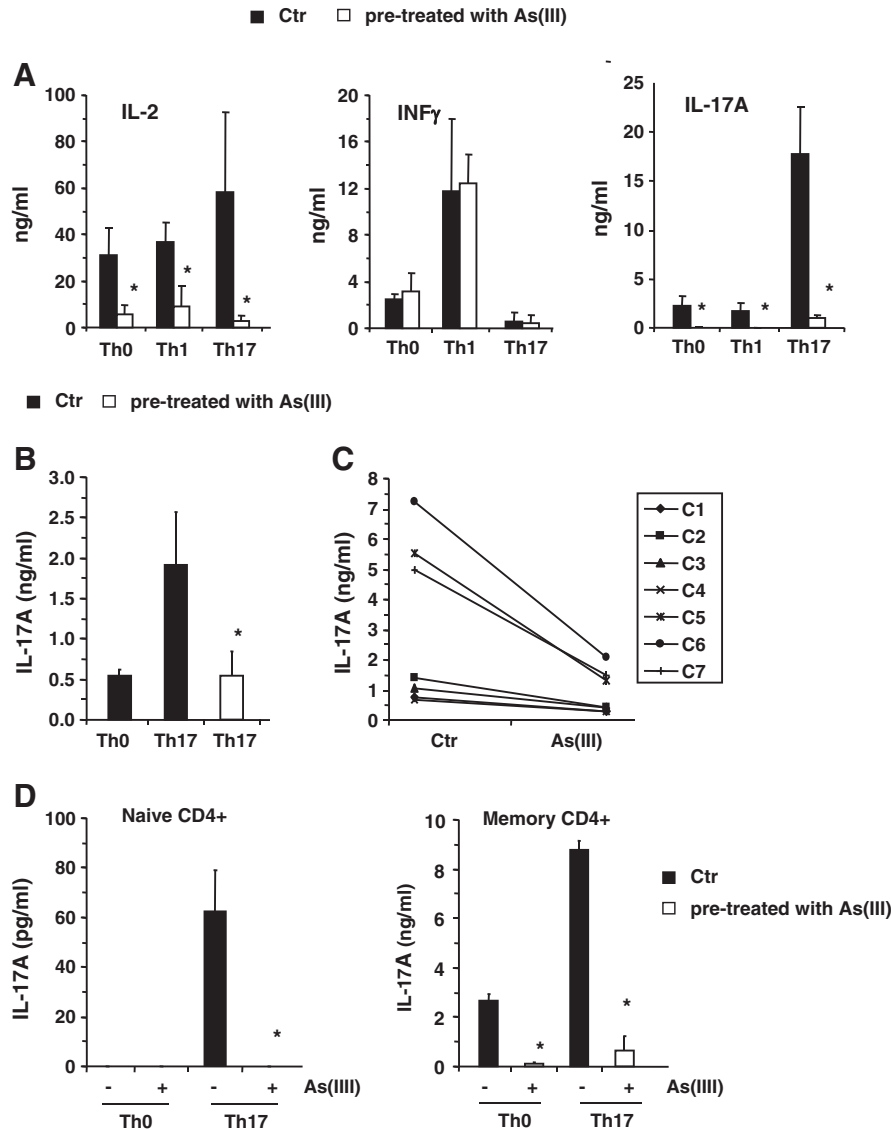


Fig. 1. As(III) inhibits secretion of IL-17A in human activated Th cells. In (A, B), Th cells were either untreated (Ctr) or pre-treated with 2 μ M As(III) for 2 h and then stimulated for 5 days with aCD3/aCD28, in the absence (Th0) or presence of differentiating cytokines and adequate Abs (Th1, Th17). In (B), after 5 days, cells were washed and re-stimulated in As(III)-free medium with PMA/ionomycin for 24 h. In (C), 7 independent cultures of Th cells (C1 to C7), differentiated for 5 days into Th17 cells in the absence of As(III), were either untreated (Ctr) or pre-treated with 2 μ M As(III) for 2 h, and then re-stimulated with PMA/ionomycin for 24 h. In (D), naïve and memory Th cells were sorted by flow cytometry, using a FACSaria cytometer, and then differentiated into Th0 or Th17 cells in the absence or presence of As(III) for 5 days. Levels of IL-2, IFN- γ and IL-17A levels in culture medium were measured by ELISA. Results are expressed as means \pm SD of at least 4 independent experiments. * p < 0.05 versus "Ctr".

Th17 cell cells ($84.8 \pm 6.4\%$ and $82.9 \pm 4.8\%$ in control Th17 cells and Th17 cells pre-treated with 2 μ M, respectively) nor the Th17 cell proliferation (data not shown).

As(III) prevents up-regulation of IL-17A, RORC and IL-21 gene expressions

IL-17 expression is controlled by different transcription factors among which the orphan nuclear receptor ROR γ t, encoded by RORC gene, plays a central role (Manel et al., 2008). Interestingly, As(III) almost totally inhibits IL-17A gene expression and strongly reduces RORC mRNA levels in both Th0 and fully differentiated Th17 cells (Fig. 2A). In contrast, the metalloid only weakly decreases mRNA levels of IRF4 and aryl hydrocarbon receptor (AhR) genes, which encode two transcription factors that also positively regulate IL-17 expression (Hirahara et al., 2011). Repression of RORC gene likely contributes to, but can not fully explain the inhibition of IL-17A gene expression in As-Th17 cells. Indeed, As(III) potentially inhibits early expression of IL-17A gene in Th cells stimulated for 6 h with both aCD3/aCD28 and the Th17 differentiating cytokine cocktail

(IL-1 β , IL-6, IL-23 and TGF β) (Fig. 2B); at this time, RORC gene is not expressed (Fig. 2B) and an increase of its mRNA levels cannot be detectable until 48 h of stimulation (data not shown). Initial expression of IL-17 can be controlled by different mechanisms triggered by the differentiating cytokines or/and by the aCD3/aCD28-induced TCR engagement. First,

Table 1

As(III) reduces secretion of IL-17A, IL-2 and IL-22 from activated Th17 cells.

(ng/ml)	+ As(III) (μ M)				
	Ctr	0.1	0.25	1	2
IL-17A	13.7 \pm 1.4	13.1 \pm 0.7	7.5 \pm 1.8*	4.9 \pm 1*	0.8 \pm 0.2*
IL-2	59.3 \pm 11.6	57.4 \pm 12.6	45.9 \pm 9.7*	17.7 \pm 8.7*	3.8 \pm 3.7*
IL-22	7.8 \pm 2	6.5 \pm 2.1	5.3 \pm 1.5*	3.8 \pm 1.5*	1.7 \pm 1*

Th cells were either untreated (Ctr) or pre-treated with indicated concentrations of As(III) for 2 h and then differentiated into Th17 cells for 5 days. IL-17A, IL-2 and IL-22 levels in culture medium were analyzed by ELISA. Results are expressed as means \pm SD of 4 independent experiments. * p < 0.05 versus "Ctr".

the Th17-differentiating cytokines rapidly activate the transcription factor STAT3 by increasing phosphorylation of its Tyr-705 residues (Hirahara et al., 2011). Like ROR γ t, phospho(Tyr705)-STAT3 can directly bind to the IL-17A promoter and stimulate IL-17A mRNA synthesis. In our study, the cytokine cocktail strongly increases the level of phospho(Tyr-705)-STAT3 after a short stimulation. Although As(III) inhibits STAT3 activation in other cell types (Wetzler et al., 2006), pre-treatment with the metalloid could not prevent Tyr-705 phosphorylation of STAT3 in activated Th cells (data not shown). In contrast, As(III) markedly prevents the increase of IL-17A mRNA levels in Th cells activated with aCD3/aCD28 alone for 2 h or 6 h (Fig. 2C). Interestingly, the metalloid also significantly reduces the levels of IL-21 mRNA. IL-21 can

indirectly promote IL-17A expression by synergizing with TGF β to induce RORC expression in human Th cells (Yang et al., 2008). In contrast, as observed in As-Th17 cells, As(III) cannot significantly prevent induction of IRF4 gene in Th cells activated for 2 h or 6 h (Fig. 2C). It can be noted that reduced IL-21 mRNA levels are also observed, at day 5, in Th0 and As-Th17 cells (data not shown).

Since As(III) is a well-known pro-oxidant metalloid (Kumagai and Sumi, 2007), we next determined if this metalloid can repress early expression of both IL-17A and IL-21 genes by modulating redox-sensitive pathways in aCD3/aCD28-stimulated Th cells. Fig. 2D demonstrates that As(III) impairs neither the phosphorylation of AKT nor that of I κ B α and ERK. However, it reduces JNK phosphorylation, although not in all cell

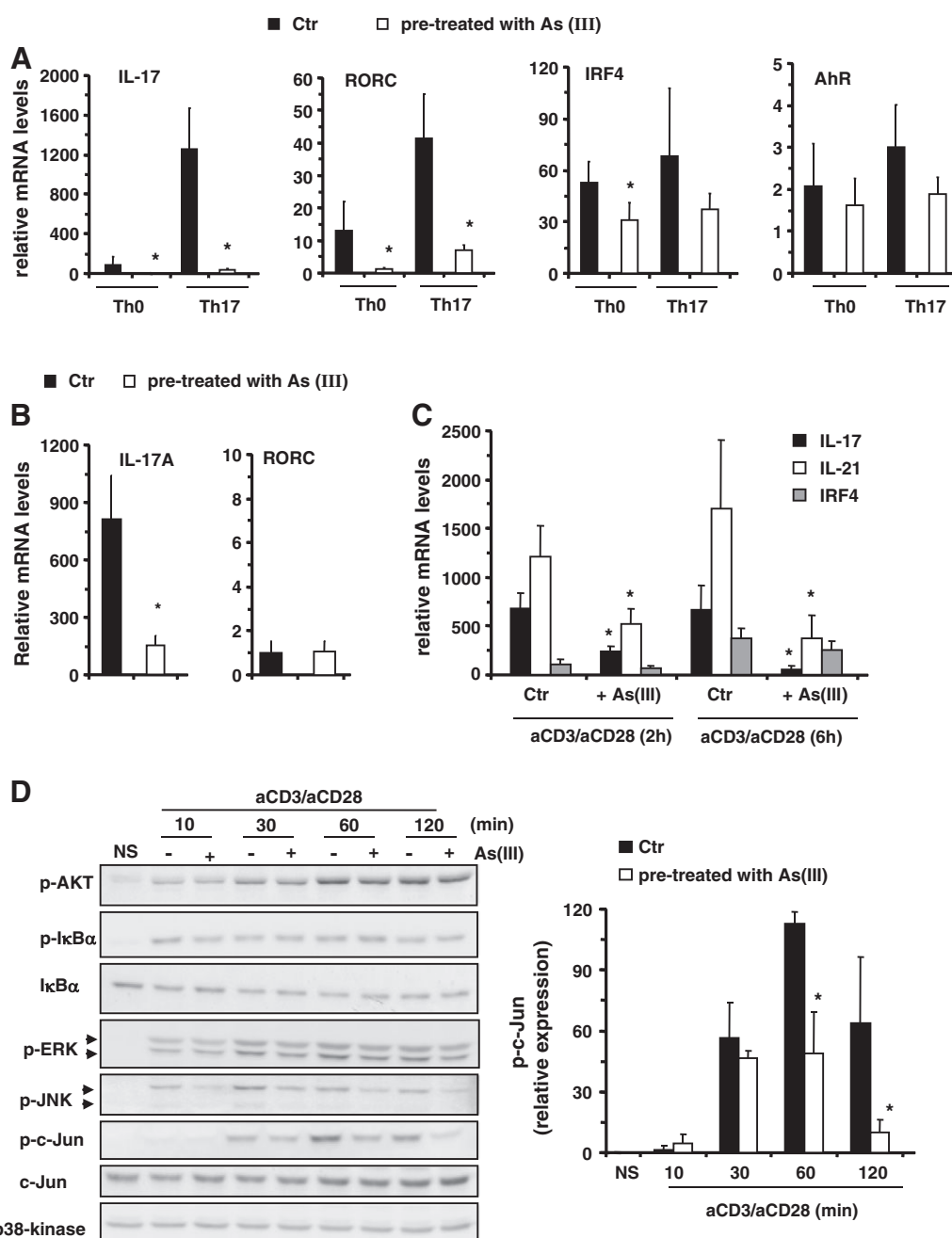


Fig. 2. As(III) prevents induction of IL-17A, RORC and IL-21 mRNA levels in activated Th cells. Cells were either untreated (Ctrl) or pre-treated with 2 μ M As(III) for 2 h. In (A, B) cells were then non stimulated or co-stimulated with aCD3/aCD28 in the absence (A, Th0) or presence of the Th17-differentiating cytokines for 5 days (A) or for 6 h (B). In (C, D), cells were non stimulated (NS) or stimulated with aCD3/aCD28 for the indicated times. In (A–C), total RNAs were isolated and mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in non-stimulated Th cells, arbitrarily set at the value of 1. In (D) protein and phospho(p)-protein expressions were analyzed by Western blot (left panel). Densitometric analysis of p-c-Jun expression is presented in the right panel. Results are expressed as means \pm SD of 4 (A–C) and 5 (D) independent experiments. * $p < 0.05$ versus respective “Ctrl”.

cultures, and it systematically inhibits the activating phosphorylation of c-Jun on serine 63. In order to assess the role of the JNK/c-Jun pathway in the metalloid effects, we finally analyzed the impact of the JNK inhibitor SP600125 on cytokine expression. As expected, SP600125 strongly inhibits activating phosphorylation of c-Jun on serine 63 (data not shown). Moreover, like As(III), it significantly reduces the expression of IL17A and IL-21 genes, but not that of IRF4 gene, in Th cells stimulated for 2 h and 6 h (Table 2).

Discussion

We demonstrate in the present study that As(III) almost totally blocks IL-17A expression in human Th17 cells. This inhibition is associated with the repression of RORC and IL-21 genes which play a central role in the differentiation of Th17 cells and the optimal production IL-17A. Moreover, the metalloid markedly reduces initial expression of IL-17A induced by Th cell co-stimulation, in part through impairment of the JNK-c-Jun signaling pathway.

Our results show that, *in vitro*, As(III) does not interfere with the secretion of IFN- γ from activated Th1 cells. In contrast, As(III) fully inhibits secretion of IL-17A from both naïve and memory activated Th17 cells. Such effects are persistent and stable since IL-17A secretion from As-Th17 cells is still significantly reduced after a second round of stimulation in As(III)-free medium. As(III) inhibits IL-17 expression without inducing cytotoxicity or decreasing cell proliferation. In contrast, the metalloid likely interferes with specific molecular mechanisms controlling IL-17A expression. In fully differentiated Th17 cells, high IL-17A expression is positively controlled by several transcription factors, such as IRF4, AhR and ROR γ t, whose expression is significantly induced during differentiation (Unutmaz, 2009). Among them, ROR γ t, encoded by RORC gene, is considered to play a key role for inducing and stabilizing IL-17A expression (Manel et al., 2008). Interestingly, As(III) strongly prevents induction of RORC gene in Th17 cells; this effect seems selective since it alters neither expression of IRF4 nor AhR. We did not determine the specific signaling by which As(III) represses RORC gene expression. However, we found that the metalloid potentially reduces IL-21 expression in As-Th17 cells. In concert with TGF β 3, IL-21 increases RORC gene expression and consequently promotes Th17 cell development (Yang et al., 2008). As(III)-dependent down-regulation of IL-21 gene expression may thus explain, at least in part, the effect of the metalloid on RORC gene expression.

It should be noted that RORC gene expression is delayed during Th17 differentiation program and that ROR γ t cannot mediate the early induction of IL-17 gene. Indeed, our results indicate that RORC gene is not expressed in Th cells co-stimulated for 6 h (Fig. 2B) whereas they clearly demonstrate that, at this time, both IL-17A and IL-21 mRNA levels are highly increased (Fig. 2C). Importantly, As(III) significantly represses expression of both IL-17A and IL-21 genes in Th cells co-stimulated with aCD3/aCD28 alone for 2 h or 6 h. These results thus suggest that As(III) probably represses global IL-17A and IL-21 expressions by impairing early responses triggered by the co-stimulation. This

hypothesis is further supported by the fact that As(III) also strongly blocks IL-17A secretion when the metalloid is only added in culture medium just before re-stimulation of control Th17 cells (Fig. 1C).

As(III) is a major pro-oxidant metalloid that alters several cell functions through direct binding to critical cysteine residues in key proteins or by promoting reactive oxygen species (Kumagai and Sumi, 2007). Analysis of the redox-sensitive signaling pathways rapidly activated by aCD3/aCD28 reveals that As(III) selectively represses the JNK/c-Jun pathway. Interestingly, like As(III), the JNK inhibitor SP600125, prevents c-Jun phosphorylation and strongly reduces early expression of IL-17A and IL-21 genes in Th cells co-stimulated with aCD3/aCD28 alone. These results suggest that inhibition of c-Jun activation can mediate As(III) effects on these cytokine expressions. Although this possibility requires additional experiments to be fully validated, it can be noted that c-Jun, or other related AP-1 proteins, control expression of IL-17A and IL-21 genes in human T lymphocytes (Schraml et al., 2009; Mizuguchi et al., 2009).

IL-17A is markedly involved in development of several autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, experimental autoimmune encephalitis or Crohn's disease in humans and animals (Iwakura et al., 2011). IL-17A promotes the development of inflammation by inducing the expression of several genes encoding pro-inflammatory cytokines (Tumor Necrosis Factor, IL-1 and IL-6), chemokines (CXCL1, IL-8, CCL7) and metalloproteinases in fibroblasts, endothelial cells and epithelial cells (Iwakura et al., 2011). Invalidation of IL-17A expression in murine models of autoimmune diseases generally reduces inflammatory visceral lesions and improves animal health. In addition to IL-17A, IL-21 is a pro-inflammatory cytokine mostly secreted by activated Th cells, including Th17 cells. IL-21 positively regulates functional activity of Th cells, B cells and NK cells; it also stimulates non immune cells to produce inflammatory mediators (Monteleone et al., 2009). Several experiments have reported that, like IL-17A, IL-21 can promote autoimmune diseases (Monteleone et al., 2009; Wang et al., 2011). The demonstration that As(III) potentially inhibits the expression of both IL-17A and IL-21 in human activated Th cells thus suggests that the metalloid might be a promising agent to treat immune-mediated diseases in humans. This idea is supported by the fact that i) As(III) concentrations *in vitro* blocking IL-17A expression (0.25 to 1 μ M) are clinically achievable in plasma of APL patients treated by this metalloid (Shen et al., 1997) and ii) *in vivo*, As(III) markedly prevents the development of severe inflammatory syndromes in different murine models and reduces the release of pro-inflammatory cytokines, including that of IL-17 (Bobé et al., 2006; Singer et al., 2011; Kaviani et al., 2012).

In conclusions, our results demonstrate that *in vitro* As(III) markedly represses expression of IL-17A in human Th17 cells that therefore constitute new targets of the metalloid. They also further strengthen the interest for new researches investigating therapeutic effects of this anticancer agent towards human immune-mediated diseases.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer and La Ligue contre le cancer du Grand Ouest (comités 35, 44, 49). We thank Laetitia Louarn for her technical contribution to some experiments.

References

- Biswas, R., Ghosh, P., Banerjee, N., Das, J.K., Sau, T., Banerjee, A., Roy, S., Ganguly, S., Chatterjee, M., Mukherjee, A., Giri, A.K., 2008. Analysis of T-cell proliferation and cytokine secretion in the individuals exposed to arsenic. *Hum. Exp. Toxicol.* 27, 381–386.

Table 2

The JNK inhibitor SP600125 reduces IL-17A and IL-21 mRNA gene expression in activated Th cells.

	2 h		6 h	
	Ctr	SP600125	Ctr	SP600125
IL-17	1 \pm 0.08	0.55 \pm 0.16*	1 \pm 0.3	0.34 \pm 0.1*
IL-21	1 \pm 0.06	0.35 \pm 0.08*	1 \pm 0.03	0.21 \pm 0.08*
IRF4	1 \pm 0.04	1.04 \pm 0.31	1 \pm 0.03	0.90 \pm 0.26

Cells were untreated (Ctr) or pre-treated with 20 μ M SP600125 for 2 h, and then stimulated with aCD3/aCD28 for the indicated times. Total RNAs were isolated and mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in Ctr Th cells stimulated with aCD3/aCD28, arbitrarily set at the value of 1. Results are expressed as means \pm SD of 4 independent experiments. * p < 0.05 versus respective "Ctr".

- Bobé, P., Bonardelle, D., Benihoud, K., Opolon, P., Chelbi-Alix, M.K., 2006. Arsenic trioxide: a promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice. *Blood* 108, 3967–3975.
- Broady, R., Yu, J., Chow, V., Tantiworawit, A., Kang, C., Berg, K., Martinka, M., Ghoreishi, M., Dutz, J., Levings, M.K., 2010. Cutaneous GVHD is associated with the expansion of tissue-localized Th1 and not Th17 cells. *Blood* 116, 5748–5751.
- Chen, Z., Tato, C.M., Muul, L., Laurence, A., O'Shea, J.J., 2007. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum.* 56, 2936–2946.
- Chen, Y., Parvez, F., Gamble, M., Islam, T., Ahmed, A., Argos, M., Graziano, J.H., Ahsan, H., 2009. Arsenic exposure at low-to-moderate levels and skin lesions, arsenic metabolism, neurological functions, and biomarkers for respiratory and cardiovascular diseases: review of recent findings from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study (HEALS) in Bangladesh. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 184–192.
- Chen, S.J., Zhou, G.B., Zhang, X.W., Mao, J.H., de Thé, H., Chen, Z., 2011. From an old remedy to a magic bullet: molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of arsenic in fighting leukemia. *Blood* 117, 6425–6437.
- Damsker, J.M., Hansen, A.M., Caspi, R.R., 2011. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183, 211–221.
- Galicia, G., Leyva, R., Tenorio, E.P., Ostrosky-Wegman, P., Saavedra, R., 2003. Sodium arsenite retards proliferation of PHA-activated T cells by delaying the production and secretion of IL-2. *Int. Immunopharmacol.* 3, 671–682.
- Hirahara, K., Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Kanno, Y., O'Shea, J.J., 2011. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 425–434.
- Hou, L.F., He, S.J., Li, X., Yang, Y., He, P.L., Zhou, Y., Zhu, F.H., Yang, Y.F., Li, Y., Tang, W., Zuo, J.P., 2011. Oral administration of artemisinin analog SM934 ameliorates lupus syndromes in MRL/lpr mice by inhibiting Th1 and Th17 cell responses. *Arthritis Rheum.* 63, 2445–2455.
- Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S., Nakae, S., 2011. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34, 149–162.
- Jeanne, M., Lallemand-Breitenbach, V., Ferhi, O., Koken, M., Le Bras, M., Duffort, S., Peres, L., Berthier, C., Soilihi, H., Raught, B., de Thé, H., 2010. PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As2O3. *Cancer Cell.* 13, 88–98.
- Kappel, L.W., Goldberg, G.L., King, C.G., Suh, D.Y., Smith, O.M., Ligh, C., Holland, A.M., Grubin, J., Mark, N.M., Liu, C., Iwakura, Y., Heller, G., van den Brink, M.R., 2009. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* 113, 945–952.
- Kavian, N., Marut, W., Servettaz, A., Laude, H., Nicco, C., Chéreau, C., Weill, B., Batteux, F., 2012. Arsenic trioxide prevents murine sclerodermatous graft-versus-host disease. *J. Immunol.* <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1103538>.
- Kumagai, Y., Sumi, D., 2007. Arsenic: signal transduction, transcription factor, and bio-transformation involved in cellular response and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 243–262.
- Lemarie, A., Morzadec, C., Bourdonnay, E., Fardel, O., Vernhet, L., 2006. Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic. *J. Immunol.* 177, 3019–3027.
- Leppkes, M., Becker, C., Ivanov, I.I., Hirth, S., Wirtz, S., Neufert, C., Pouly, S., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Becher, B., Littman, D.R., Neurath, M.F., 2009. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 136, 257–267.
- Manel, N., Unutmaz, D., Littman, D.R., 2008. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat. Immunol.* 9, 641–649.
- Martin-Chouly, C., Morzadec, C., Bonvalet, M., Galibert, M.D., Fardel, O., Vernhet, L., 2011. Inorganic arsenic alters expression of immune and stress response genes in activated primary human T lymphocytes. *Mol. Immunol.* 48, 956–965.
- Mizuguchi, M., Asao, H., Hara, T., Higuchi, M., Fujii, M., Nakamura, M., 2009. Transcriptional activation of the interleukin-21 gene and its receptor gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in human T-cells. *J. Biol. Chem.* 284, 25501–25511.
- Monteleone, G., Pallone, F., Macdonald, T.T., 2009. Interleukin-21 as a new therapeutic target for immune-mediated diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 441–447.
- Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.L., Smith, W.A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S., Hatton, R.D., Stormo, G.D., Weaver, C.T., Russell, J.H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., 2009. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* 460, 405–409.
- Shen, Z.X., Chen, G.Q., Ni, J.H., Li, X.S., Xiong, S.M., Qiu, Q.Y., Zhu, Z., Tang, W., Sun, G.L., Yang, K.Q., Chen, Y., Zhou, L., Fang, Z.W., Wang, Y.T., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Chen, S.J., Chen, Z., Wang, Z.Y., 1997. Use of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 89, 3354–3360.
- Singer, M., Trugnan, G., Chelbi-Alix, M.K., 2011. Arsenic trioxide reduces 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced murine colitis via nuclear factor-kappaB down-regulation and caspase-3 activation. *Innate Immunol.* 17, 365–374.
- Soto-Pena, G.A., Luna, A.L., Acosta-Saavedra, L., Conde, P., Lopez-Carrillo, L., Cebrian, M.E., Bastida, M., Calderon-Aranda, E.S., Vega, L., 2006. Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *FASEB J.* 20, 779–781.
- Unutmaz, D., 2009. RORC2: the master of human Th17 cell programming. *Eur. J. Immunol.* 39, 1452–1455.
- Wang, L., Yu, C.R., Kim, H.P., Liao, W., Telford, W.G., Egwuagu, C.E., Leonard, W.J., 2011. Key role for IL-21 in experimental autoimmune uveitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 9542–9547.
- Wetzler, M., Brady, M.T., Tracy, E., Li, Z.R., Donohue, K.A., O'Loughlin, K.L., Cheng, Y., Mortazavi, A., McDonald, A.A., Kunapuli, P., Wallace, P.K., Baer, M.R., Cowell, J.K., Baumann, H., 2006. Arsenic trioxide affects signal transducer and activator of transcription proteins through alteration of protein tyrosine kinase phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* 12, 6817–6825.
- Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., Hafler, D.A., 2008. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454, 350–352.
- Zhao, X.Y., Xu, L.L., Lu, S.Y., Huang, X.J., 2011. IL-17-producing T cells contribute to acute graft-versus-host disease in patients undergoing unmanipulated blood and marrow transplantation. *Eur. J. Immunol.* 41, 514–526.
- Zhu, J., Paul, W.E., 2010. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev.* 238, 247–262.



Inorganic arsenic impairs proliferation and cytokine expression in human primary T lymphocytes[☆]

Claudie Morzadec^a, Fidaa Bouezzedine^a, Mélinda Macoch^a, Olivier Fardel^{a,b}, Laurent Vernhet^{a,*}

^a UMR INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France

^b Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2012

Received in revised form 23 May 2012

Accepted 25 May 2012

Available online 6 June 2012

Keywords:

Arsenic
T lymphocytes
Proliferation
Cytokines
Stress

ABSTRACT

Inorganic arsenic is a toxic environmental contaminant to which humans are mainly exposed through drinking water. This metalloid impairs functions of several key immune cells. Particularly, it reduces IL-2 secretion and proliferation of blood peripheral mononuclear cells stimulated by lectins that, however, do not mimic physiological T cell activation. The present study used isolated human T cells activated, in a more physiological manner, through stimulation with CD3/CD28 antibodies, to carefully analyze the impact of arsenic on T cell proliferation and cytokine expression. We demonstrate that non cytotoxic concentrations of sodium arsenite (As(III), 0.25–2 μ M) significantly reduce T cell proliferation by increasing the percentage of non dividing cells blocked in G1 phase and by preventing cyclin D3 and CDC25A expression. They also markedly, although not totally, reduces IL-2 expression at both mRNA and protein levels; however, metalloid-dependent inhibition of T cells could not be reversed by addition of recombinant IL-2. In addition, As(III) markedly reduces secretion of interferon- γ without impairing that of IL-4 and IL-13; it also decreases interferon- γ mRNA levels but increases those of IL-13. Finally, simultaneously to its immune effects, As(III) rapidly and potentially increases expression of the redox-sensitive genes HMOX1, NQO1 and GCLM in activated T cells without altering the levels of reactive oxygen species. In conclusion, our results demonstrate that As(III) inhibits T cell proliferation, independently of IL-2, and alters the Th balance of cytokines secreted by co-stimulated T cells which thus constitute direct targets of this major environmental contaminant.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Inorganic arsenic (iAs) is a toxic environmental contaminant to which millions of individuals are exposed over the world mainly through drinking water. This metalloid is notably recognized as a major carcinogen for human and is still classified at the first rank in the 2011 priority list of hazardous substances by the Agency for Toxic Substance and Disease register (www.atsdr.cdc.gov/spl). Epidemiological studies have demonstrated that an increased

exposure to iAs is positively correlated with the incidence of skin and lung cancers. In addition, chronic metalloid exposure promotes severe, non tumoral, pulmonary, hepatic and neurological diseases (Das and Sengupta, 2008; Chen et al., 2009).

iAs is also a known immunosuppressive metalloid that impairs *in vivo* and *in vitro* physiology of several key immune cells. First, iAs stimulates *in vitro* apoptosis of human neutrophils in part by activation of mitogen-activated protein kinases (Binet and Girard, 2008). In addition, we recently demonstrated that, *in vitro*, low micromolar concentrations of the metalloid, in the range of those measured in plasma of exposed individuals, not only reduce the differentiation of human peripheral blood monocytes into functional macrophages (Lemarie et al., 2006a), but also reverse major phenotypic and genetic features of human mature macrophages (Lemarie et al., 2006b; Bourdonnay et al., 2009a). Similar impaired differentiation of macrophages was observed *ex vivo* with human monocytes collected from individuals environmentally exposed to iAs (Banerjee et al., 2009). Besides phagocytes, the metalloid alters functions of human T cells. Different studies have shown that reduced *ex vivo* blood peripheral mononuclear cells (PBMCs) proliferation and interleukin-2 (IL-2) secretion are significantly associated with increased metalloid concentrations in urines of chronically exposed individuals (Biswas et al., 2008; Soto-Pena

Abbreviations: iAs, inorganic arsenic; aCD3/aCD28, antibodies directed against CD3 and CD28; As(III), sodium arsenite; PBMC, blood peripheral mononuclear cells; IL, interleukin; IFN, interferon; TCR, T cell receptor; Th, T helper; HMOX1, heme oxygenase 1; NQO1, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1; GCLM, modifier subunit for glutamate-cysteine ligase; ROS, reactive oxygen species; PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; MLR, mixed leukocyte reactions; RT-qPCR, reverse transcription-real time quantitative PCR assay; DC, dendritic cells; CFSE, carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester; MFI, mean fluorescence intensity; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; CDK, cyclin-dependent kinase.

[☆] This work was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer and les comités départementaux de la Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest (comités 35, 44, 49).

* Corresponding author. Tel.: +33 2 23 23 48 07; fax: +33 2 23 23 47 94.

E-mail address: laurent.vernhet@univ-rennes1.fr (L. Vernhet).

et al., 2006). Such an alteration of T cell functions was also observed with splenocytes from mice exposed to iAs by intra-gastric route (Soto-Pena and Vega, 2008) and with human PBMCs incubated *in vitro* with sodium arsenite (As(III)), an inorganic arsenical trivalent salt (Galicía et al., 2003; Tenorio and Saavedra, 2005).

Immunosuppression of T cell activity may contribute to some major systemic effects of the metalloid. Notably, chronic exposure to iAs mainly increases the incidence of skin carcinoma that are also induced by long term immunosuppressive therapy administered to transplanted patients (Euvrard et al., 2003). Inhibition of T cell function reduces tumor immunosurveillance and favors skin co-carcinogenic effects of iAs (Smyth et al., 2001; Rossman et al., 2004). In addition, immunosuppression promotes the development of infection. Interestingly, toxicological and epidemiological studies have demonstrated that increased incidence and severity of

infectious diseases can be observed in mice or individuals exposed to low iAs concentrations (Kozul et al., 2009; Rahman et al., 2011; Argos et al., 2010).

Although it has already been reported that iAs can alter T cell functions, most, if not all, published studies concern iAs-exposed PBMCs stimulated *ex vitro* or *in vitro* with lectins such as phytohemagglutinin or concanavalin-A (Biswas et al., 2008; Soto-Pena et al., 2006; Galicía et al., 2003; Tenorio and Saavedra, 2005). Unfortunately, these non specific mitogens do not trigger T cell receptor (TCR) engagement which mimics physiological T cell activation. Indeed, lectins bind to a large number of membrane glycoproteins and they absolutely require an accessory signal, likely provided by activated monocytes, to induce T cell proliferation (Ceuppens et al., 1988; Jungo et al., 2001). Instead, T cells are normally activated by a double signal that involves TCR engagement and

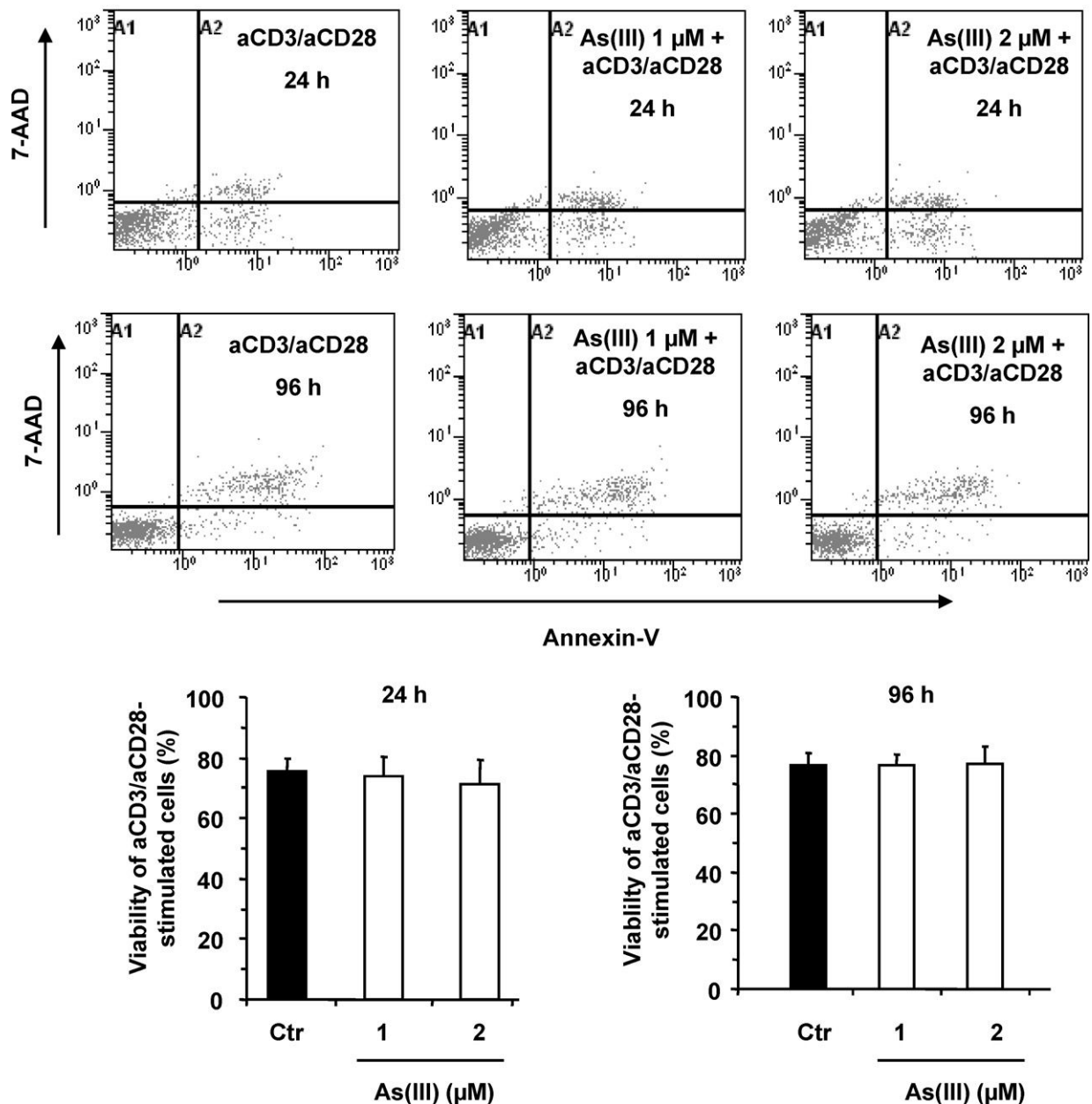


Fig. 1. As(III) does not alter viability of human CD3⁺ T cells. T cells were either untreated (Ctr) or pre-treated with As(III) for 2 h and then stimulated with aCD3/aCD28 for 24 or 96 h in the absence or presence of the metalloid. Cell viability was next determined by flow cytometry using the fluorescent dye 7-aminoactinomycin D and PE-conjugated Annexin-V. Results are expressed as means \pm SD of 4 and 8 independent experiments for cells stimulated for 24 h and 96 h, respectively. Representative graphs saved during flow cytometry analysis are presented on the upper panel.

co-stimulation of the integrin- β 7 CD28 receptors. The impact of iAs on isolated human T cells co-stimulated through direct physiological TCR engagement is thus unknown.

In the present study, we demonstrate that sodium arsenite (As(III)), a trivalent inorganic salt, dose-dependently reduces proliferation of isolated human blood CD3+ T cells co-stimulated with antibodies directed against CD3 and CD28 (aCD3/aCD28). Such effects are independent of the ability of As(III) to repress IL-2 gene expression. Besides IL-2, As(III) also significantly reduces expression of interferon- γ (IFN- γ) but not that of IL-4 and IL-13 genes. Finally, we show that, simultaneously to its immune effects, As(III) rapidly increases expression of the stress gene heme oxygenase 1 (HMOX1), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and modifier subunit for glutamate-cysteine ligase (GCLM) without altering reactive oxygen species (ROS) levels in activated T cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents and antibodies

As(III), lipopolysaccharide, phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and ionomycin were from Sigma–Aldrich. The Src kinase inhibitor PP2 was purchased from Calbiochem. Antibodies against p27^{Kip1} were purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme). Other primary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-Bio). FITC- and PE-conjugated antibodies were obtained from BD Biosciences.

2.2. Isolation and culture of human T cells

PBMCs were isolated from blood buffy coats of healthy donors, provided by Etablissement Français du Sang, through Ficoll gradient centrifugation; donors were healthy, but their other main characteristics were not disclosed by the Etablissement Français du Sang. After separation of monocytes by a 1-h adhesion step, CD3+, CD4+ and CD8+ T cells were purified from non adherent cells by negative selection using Dynabeads T cell kits specific for human CD3+, CD4+ or CD8+ T cells (Invitrogen), respectively. Cells were then cultured in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. T cells were activated with Invitrogen Dynabeads coated with aCD3/aCD28 (one bead per cell).

2.3. Cell viability

Viability was analyzed by flow cytometry using the Annexin V-based apoptotic detection kit from BD Biosciences. Cells were incubated for 15 min at 4 °C with PE-conjugated Annexin-V and 7-aminoactinomycin D and then analyzed on FC500 flow cytometer (Beckman Coulter). Viable cells were defined as cells negative for both Annexin-V and 7-aminoactinomycin D labeling.

2.4. Total RNA isolation and real-time quantitative PCR (qPCR)

Total RNAs were extracted by the TRIzol method (Invitrogen) and then analyzed by qPCR using the fluorescent dye SYBR Green methodology and an ABI Prism 7300 detector (Applied Biosystem) (Bourdonnay et al., 2009a). Specific gene primer sets were all from Qiagen (Table S1). Specificity of gene amplification was checked up at the end of qPCR through analysis of dissociation curves of the PCR products. Amplification curves were read with ABI Prism SDS software using the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA to an 18S RNA endogenous reference.

2.5. Quantification of cytokine levels

Levels of IL-2, IL-4, IL-13 and IFN- γ secreted in culture medium were quantified by ELISA using specific Duoset ELISA development system kits (R&D Systems).

2.6. Cell proliferation assay

Proliferation of T cells was determined using the Cyquant NF Cell proliferation assay kit (Molecular Probes) as previously described (Martin-Chouly et al., 2011). This assay is based on measurement of cellular DNA content via fluorescent dye binding. Cells were incubated for 30 min with the Cyquant NF DNA binding dye used in combination with a plasma membrane permeabilization reagent. DNA fluorescence intensity, which is closely proportional to cell number, was quantified with a GEMINI fluorescence microplate reader (Molecular Devices) using excitation at 485 nm and emission at 530 nm. Proliferation was quantified by subtracting mean fluorescence intensity (MFI) of non stimulated T cells, which are quiescent, to that of activated T cells pre-treated or not with As(III).

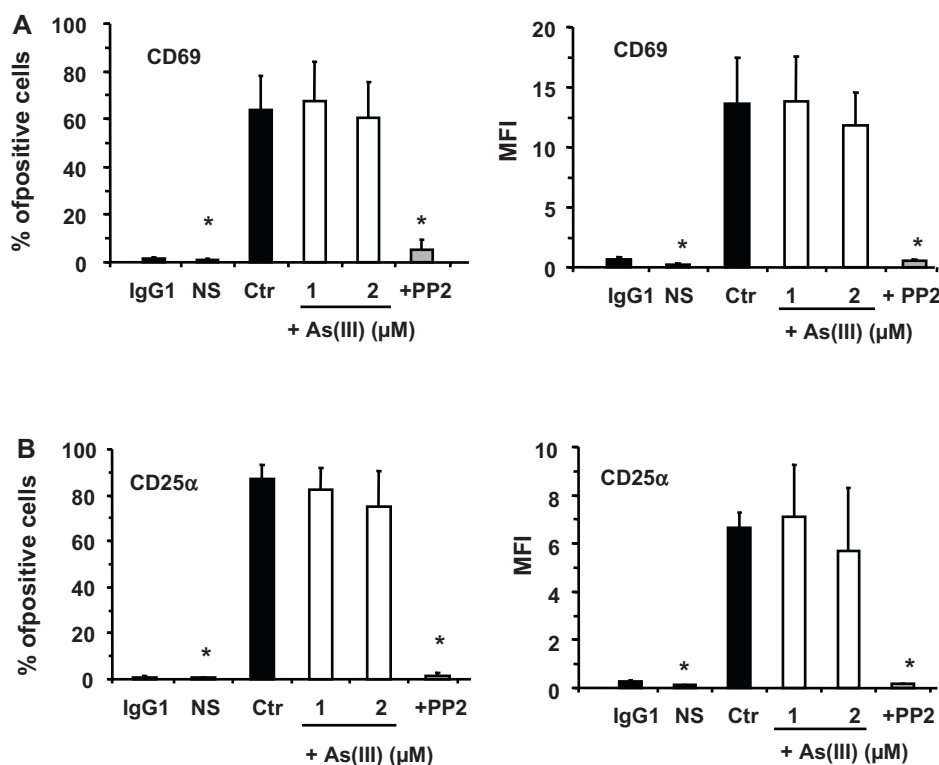


Fig. 2. As(III) does not alter membrane expression of CD69 and CD25 α in activated T cells. Cells were either untreated (Ctr), pre-treated with As(III) or with 10 μ M PP2 for 2 h. Then, cells were non stimulated (NS) or stimulated with aCD3/aCD28 for 24 h (A) or 72 h (B) in the absence or presence of the metalloid. Results are expressed as means \pm SD of 4 (CD69) and 6 (CD25 α) independent experiments and percentage of positive cells (left panels) as well as MFI (right panels) are shown. * p < 0.05 versus Ctr.

2.7. Mixed leukocytes reactions (MLR)

The ability of monocyte-derived dendritic cells (DCs) to stimulate allogeneic T cells in MLR was performed as previously described (Laupeze et al., 2002). Human peripheral blood monocytes were isolated from PBMCs using MACS CD14 microbeads (Miltenyi) according to manufacturer's instructions. Monocytes were cultured for 7 days with 800 UI/ml granulocyte-macrophage colony stimulating factor and 500 UI/ml IL-4 (Miltenyi) for generating DCs. Mature DCs were further obtained by the addition of lipopolysaccharide (100 ng/ml) for 2 days. Then, graded numbers of mature DCs were cocultured with allogeneic CD3+ T cells for 5 days. Cells were pulsed with 1 μ Ci [3 H]methyl-thymidine for the last 18 h. The incorporation of the radionuclide into DNA was further measured by β -scintillation counting. Results were expressed as radioactivity (cpm) per well.

2.8. Analysis of cell division and cell cycle by flow cytometry

To determine cell division, cells were labeled with 0.25 μ M carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes) for 10 min at 37°C, washed and rested for 1 h. Then, cells were pre-treated with As(III) for 2 h and next activated with aCD3/aCD28 for 5 days in the presence of the metalloid. Cell division was next determined by analyzing CFSE dilution using a FC500 flow cytometer. Replicative index was calculated as the sum of the cells in all generations divided by the calculated number of original parent cells. For cell cycle experiments, cells were incubated for 4 h at 4°C with staining buffer containing 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100, 200 μ g/ml A-RNase and 50 μ g/ml iodide propidium. After washings, cells were analyzed by flow cytometry using the CXP analysis software.

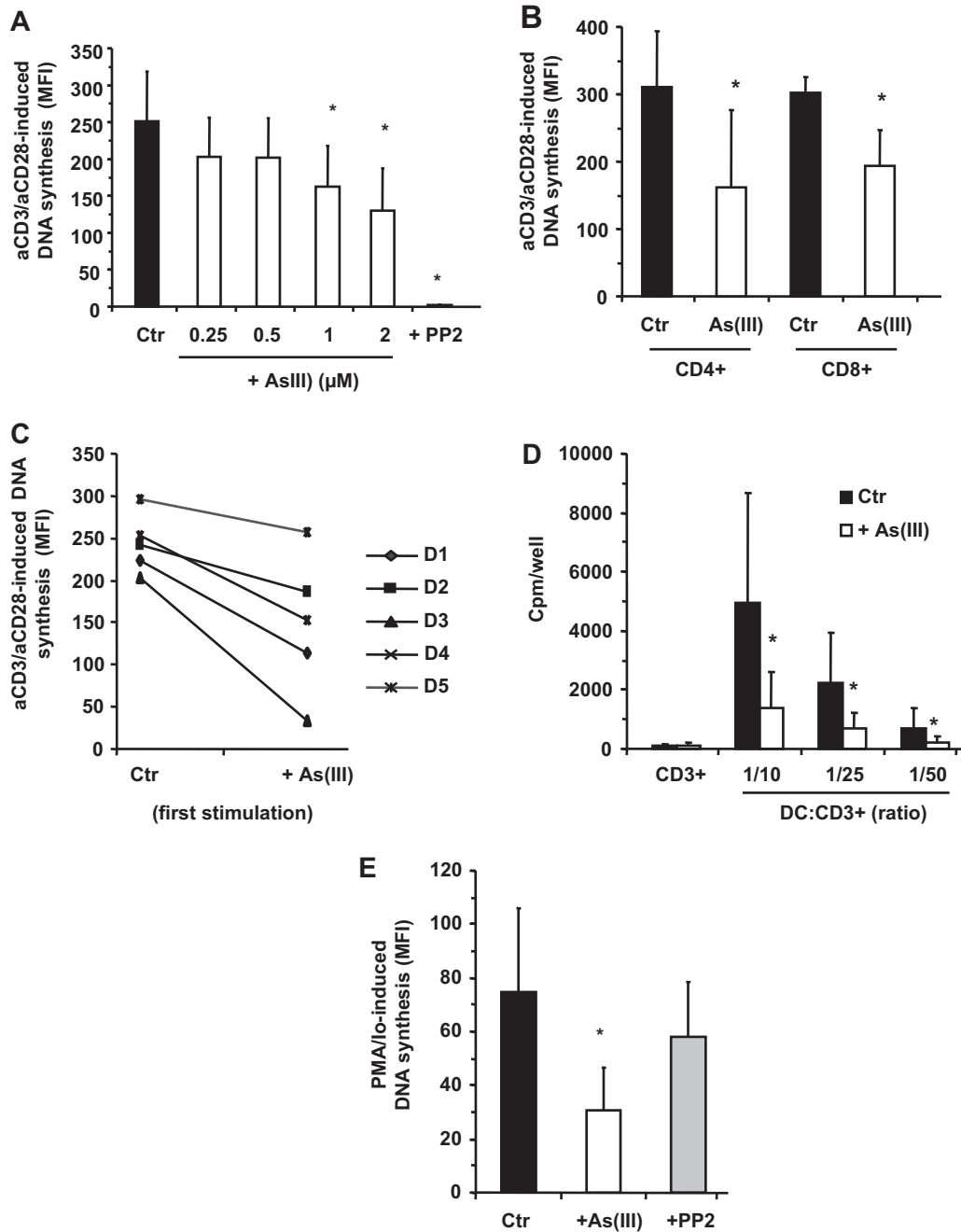


Fig. 3. As(III) significantly reduces proliferation of human T cells. Cells were untreated (Ctr), pre-treated with 2 μ M or indicated concentrations of As(III), or with 10 μ M PP2 (A, E) for 2 h. Then, cells were stimulated for 4 days either with aCD3/aCD28 (A–C) or with PMA/ionomycin (Io) (E) in the absence or presence of the metalloid. In (C), at the end of incubation, cells were washed, rested in As(III)-free medium for 48 h and then re-stimulated with aCD3/aCD28 for 4 days in the absence of As(III). In (A, B, C, E), DNA synthesis was determined by microspectrofluorimetry using the fluorescent Cyquant dye. In (D), CD3+ T cells were incubated in the absence or presence with mature DCs for 5 days and MLR were conducted as described in Section 2. Results are expressed as means \pm SD of 6 (A), 4 (B), 5 (C), 4 (D) and 6 (E) independent experiments. * p < 0.05 versus Ctr.

2.9. Western blot analysis

Cells were harvested and lysed on ice with lysis buffer as previously described (Lemarie et al., 2006b). Then, lysates were sonicated on ice and protein concentration was quantified using the Bradford's method. Samples were analyzed by 10% SDS-PAGE, and then electroblotted overnight onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). After blocking, membranes were hybridized with primary antibodies overnight at 4 °C and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies. Immunolabeled proteins were visualized by chemiluminescence.

2.10. Quantification of ROS

The levels of ROS were quantified using the redox-sensitive 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate dye (Molecular Probes) (Bourdonnay et al., 2009b). Cells were collected, washed and incubated with dye (10 μ M) for 30 min at 37 °C and then analyzed on the FC500 flow cytometer.

2.11. Statistical analysis

All independent experiments were repeated at least three times with similar results. Data are expressed as means \pm SD. Significant differences were evaluated using the Student *t*-test or the multi-range Dunnett's *t* test when multiple comparisons were studied. Criterion of significance of the difference between means was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. As(III) does not alter viability of activated T cells

We first studied cytotoxic effects of relevant environmental concentrations of As(III) (0.1–2 μ M) on CD3+ T cells stimulated with aCD3/aCD28. Cells were pre-treated with As(III) for 2 h and then

stimulated for up to 96 h in the presence of the metalloid. Analysis of cell viability by flow cytometry shows that, even at the highest concentration (2 μ M), As(III) has no cytotoxic effects on T cells stimulated for 24 h or 96 h (Fig. 1).

3.2. As(III) does not prevent induction of membrane CD69 and CD25 α expression in activated T cells

T cell activation is characterized by expression of typical surface membrane markers such as CD69 and CD25 α . CD69 is rapidly induced following TCR engagement and its membrane expression is markedly detectable at 20–24 h; expression of CD25 α is delayed and strongly measurable at 72 h (Reddy et al., 2004). Fig. 2 indicates that As(III) pre-treatment alters neither the aCD3/aCD28-induced membrane expression of CD69 (A) nor the CD25 α expression (B) in cells stimulated for 24 h and 72 h, respectively. In contrast, the Src kinase inhibitor PP2, used as a positive control to block Lck, Fyn and ZAP-70 kinase activities directly associated with TCR engagement (Lysechko and Ostergaard, 2005), almost totally inhibits induction of both CD69 and CD25 α expressions.

3.3. As(III) significantly reduces proliferation of T cells

Once activated, T cells rapidly acquire the ability to synthesize DNA and to proliferate. Fig. 3A shows that, at 1 and 2 μ M, As(III) significantly reduces, by approximately 35–45%, the cellular DNA content in CD3+ T cells stimulated with aCD3/aCD28 for

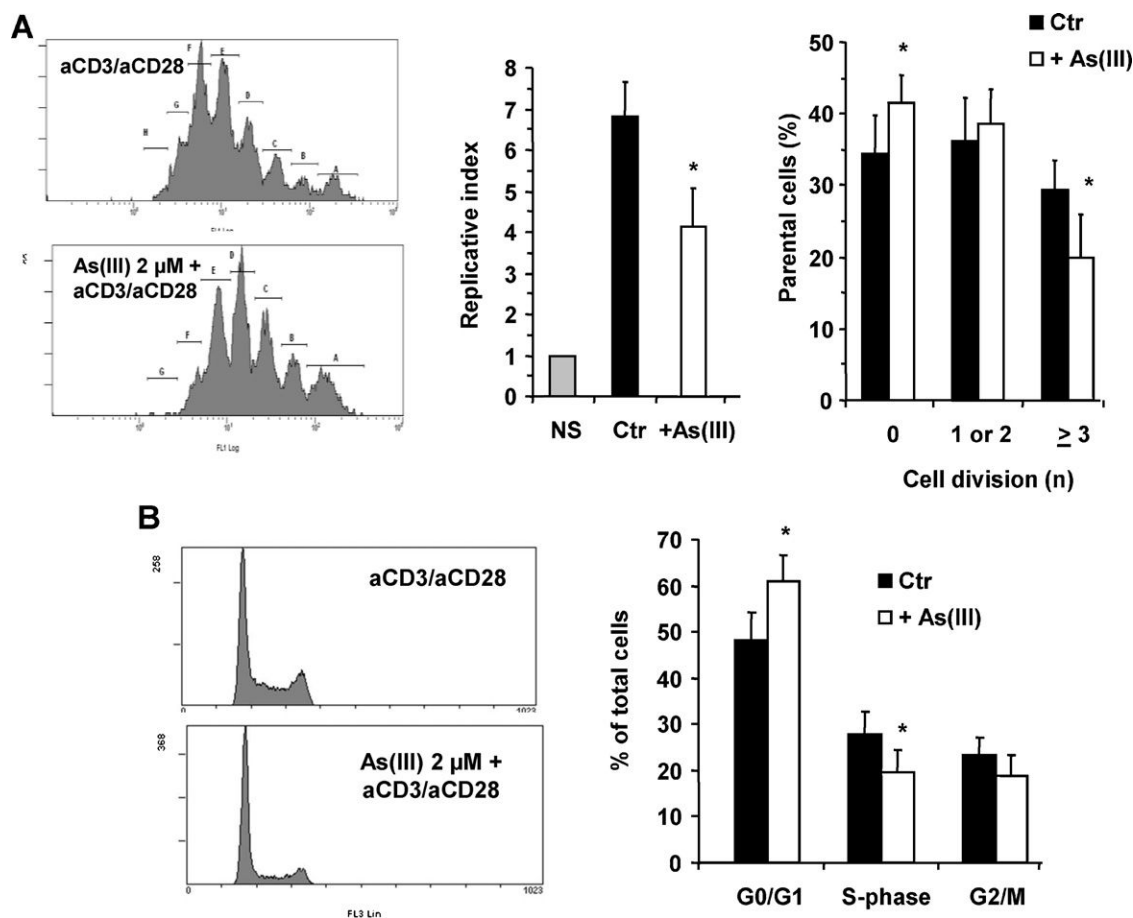


Fig. 4. As(III) alters division and cell cycle of activated T cells. Cells were untreated (Ctrl) or pre-treated with 2 μ M As(III) for 2 h. Then, cells were non-stimulated (NS), stimulated with aCD3/aCD28 for 5 days (A) or for 2 days (B) in the absence or presence of the metalloid. Cell division (A) and cell cycle (B) were analyzed by flow cytometry using CFSE dilutions and propidium iodide, respectively. Representative graphs saved during flow cytometry analysis are displayed on the left panels. Results are expressed as means \pm SD of 7 (A) and 5 (B) independent experiments. * $p < 0.05$ versus Ctrl.

4 days. As CD3+ T cells constitute a mix of helper CD4+ and cytotoxic CD8+ T cells, we determine if the metalloid can specifically alter proliferation of one particular cell type. Fig. 3B indicates that As(III) similarly reduces proliferation in CD4+ and CD8+ T cells. In some experiments, after 96 h of stimulation, control and As(III)-exposed CD3+ T cells were washed and left untreated for 48 h in metalloid-free medium. Then, an equal cell number of each culture was restimulated for 4 days with aCD3/CD28 in the absence of As(III). It is noteworthy that, in the five cultures of T cells pre-treated with As(III) during the first round of stimulation, total DNA content after restimulation with aCD3/aCD28 was still lower than that measured in their control counterparts (Fig. 3C). In order to test the effects of As(III) in another model of TCR activation, we then performed MLR with human mature DCs. Fig. 3D clearly indicates that pre-treatment of T cells with As(III) significantly reduces their proliferation induced by stimulation with successive dilutions of mature DCs. Finally, to assess if As(III) can prevent T cell proliferation by directly interfering with TCR or with downstream pathways, cells were stimulated with 20 ng/ml PMA and 1 μ M ionomycin. This stimulation bypasses TCR engagement but activates similar

downstream signaling pathways (Davis and Lipsky, 1986). Fig. 3E shows that pre-treatment with 2 μ M As(III) significantly reduces T cell proliferation induced by PMA/ionomycin stimulation. In contrast, PP2, used here as a negative control since TCR engagement is bypassed, does not alter total DNA amount in these activated cells.

3.4. As(III) reduces cell division by preventing G1/S progression and by altering expression of cell cycle proteins

To gain insight onto the mechanism by which As(III) inhibits T cell proliferation, we next analyzed cell division and cell cycle by flow cytometry. Using CFSE dilution, we demonstrate that 2 μ M As(III) significantly reduces the replicative index of T cells stimulated with aCD3/aCD28 for 5 days (Fig. 4A, middle panel). Analysis of the division number of parental T cells reveals that As(III) significantly increases the percentage of non dividing cells and decreases that of cells experiencing three or more divisions (Fig. 3A, right panel). This result thus suggests that As(III) can repress cell cycle progression. TCR co-stimulation by aCD3/aCD28 triggers the entry

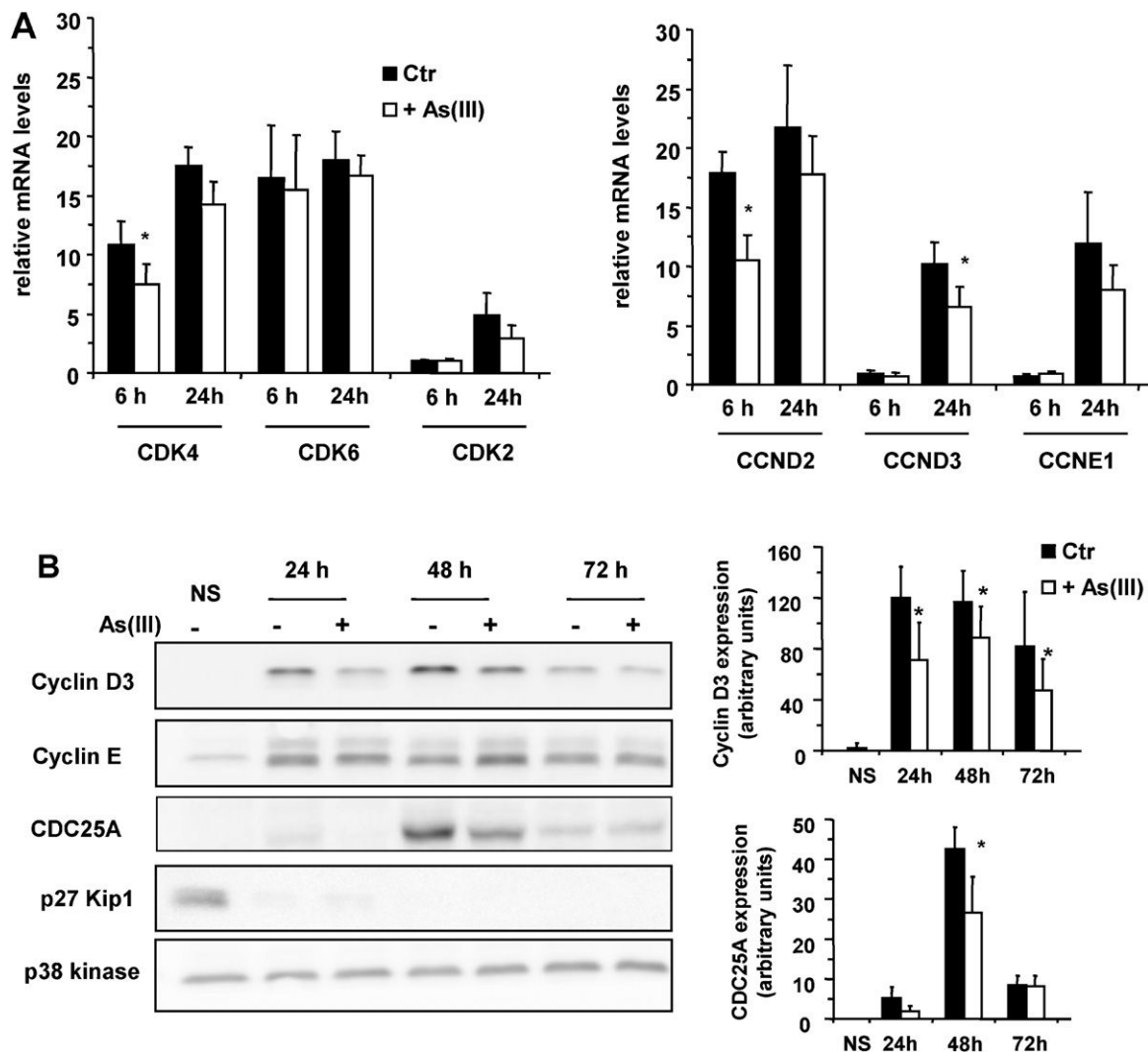


Fig. 5. As(III) reduces cyclin D3 and CDC25A expression in activated T cells. Cells were either untreated (Ctr) or pre-treated with 2 μ M As(III) for 2 h. Then, cells were non stimulated (NS), stimulated with aCD3/aCD28 for 6–24 h (A) or for 24–72 h (B) in the absence or presence of the metalloid. In (A), total RNAs were isolated and mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in As(III)-untreated and non-stimulated T cells, arbitrarily set at the value of 1. In (B), expression of cell cycle proteins, in the same whole cell extracts, was determined by Western blot. Equal gel loading was verified by re-probing nitrocellulose membrane with p38 kinase antibody. Densitometric analysis of protein expression is presented on the right panel. Results are expressed as means \pm SD of at least 4 independent experiments. * p < 0.05 versus Ctr.

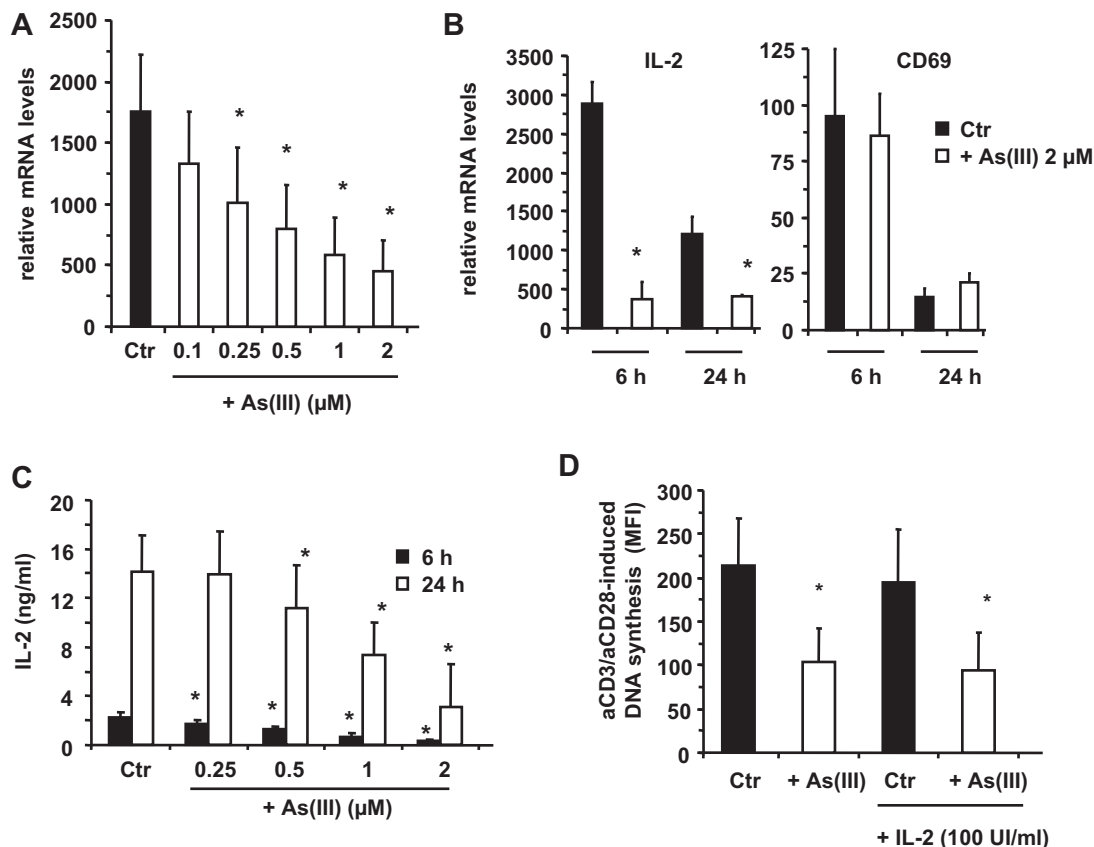


Fig. 6. Reduced T cell proliferation is independent of As(III) repressing effect on IL-2 gene. Cells were either untreated (Ctr) or pre-treated with 2 μM or indicated concentrations of As(III) for 2 h. Cells were then non stimulated, stimulated with aCD3/aCD28 for 2 h (A), 6 h, 24 h (B, C) or for 4 days (D), in the absence or presence of human recombinant IL-2 (D) or of As(III) (A–D). In (A) and (B), total RNAs were isolated and mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in As(III)-untreated and non-stimulated T cells, arbitrarily set at the value of 1. In (C), IL-2 levels in culture medium were analyzed by ELISA. In (D), DNA synthesis was determined by microspectrofluorimetry using the fluorescent Cyquant dye. Results are expressed as means ± SD of at least 4 independent experiments. **p* < 0.05 versus Ctr.

of T cells into the cell cycle and its progression through the G1 phase. Pre-treatment of T cells with 2 μM As(III) significantly reduces the percentage of cells in S-phase and increases that of T cells arrested in G1 phase after 48 h (Fig. 4B). aCD3/aCD28-dependent progression from G1 to S-phase notably results from the rapid expression of the cyclin D2/3-associated dependent kinase 4 (CDK)/CDK6 and the cyclin E-associated CDK2 (Ajchenbaum et al., 1993). As(III) does not alter the increase of CDK2, CDK4, CDK6, CCND2 (encoding cyclin D2) and CCNE1 (encoding cyclin E) mRNA expression induced by aCD3/aCD28 in T cells stimulated for 24 h (Fig. 5A). However, the metalloid significantly reduces the levels of CCND3 mRNAs which code for the cyclin D3. As(III) also markedly reduces the induction of cyclin D3 expression in cells stimulated for 24, 48 and 72 h, without affecting that of cyclin E (Fig. 5B). Activation of these cyclin–CDK complexes involves degradation of the CDK inhibitor p27^{Kip1} and transient expression of the phosphatase CDC25A that controls the remove of inhibitory phosphates from CDK (Boutros et al., 2006; Nourse et al., 1994). As(III) pre-treatment does not prevent the degradation of p27^{Kip1} induced by T cell activation, but, it significantly reduces the maximal expression of CDC25A detected in T cells stimulated for 48 h (Fig. 5B).

3.5. As(III)-dependent inhibition of T cell proliferation is not reversed by addition of exogenous IL-2

IL-2, which is rapidly induced upon T cell activation, greatly contributes to cell proliferation by promoting G1/S progression. We thus determined if As(III) can reduce DNA synthesis by altering IL-2 expression in CD3+ T lymphocytes. Interestingly, As(III)

markedly inhibits the increase of IL-2 mRNA levels in cells stimulated with aCD3/aCD28 for 2 h (Fig. 6A). Its effect is dose-dependent and significant for a concentration as low as 0.25 μM. As(III) (2 μM) also prevents the increase of IL-2 mRNA levels, but not that of CD69 mRNAs in cells stimulated for 6 h and 24 h (Fig. 6B). At the same times, As(III) significantly, but not totally, inhibits the secretion of IL-2 protein from activated CD3+ T cells (Fig. 6C). Addition of human recombinant IL-2 (100 UI/ml) from different suppliers (R&D System or Miltenyi) in culture medium, simultaneously with aCD3/aCD28-coated beads, cannot reverse growth inhibitory effects of the metalloid (Fig. 6D).

3.6. As(III) significantly reduces expression of INF-γ but not those of IL-4 and IL-13

Besides IL-2, activated T cells secrete several other cytokines. Fig. 7A clearly indicates that As(III) pre-treatment significantly and dose-dependently inhibits early secretion of INF-γ. This effect is detectable in CD3+ T cells pre-treated with 0.25 μM As(III) and activated for 24 h. In contrast, As(III) alter neither the secretion of IL-4 nor that of IL-13. The metalloid was also found to significantly reduce mRNA levels of INF-γ (Fig. 7B) but to increase those of IL-13 gene (Fig. 7C).

3.7. As(III) significantly increases mRNA levels of different stress genes but does not alter ROS levels

Simultaneously to its effects on T cell function, As(III) rapidly and potently up-regulates expression of different redox-sensitive

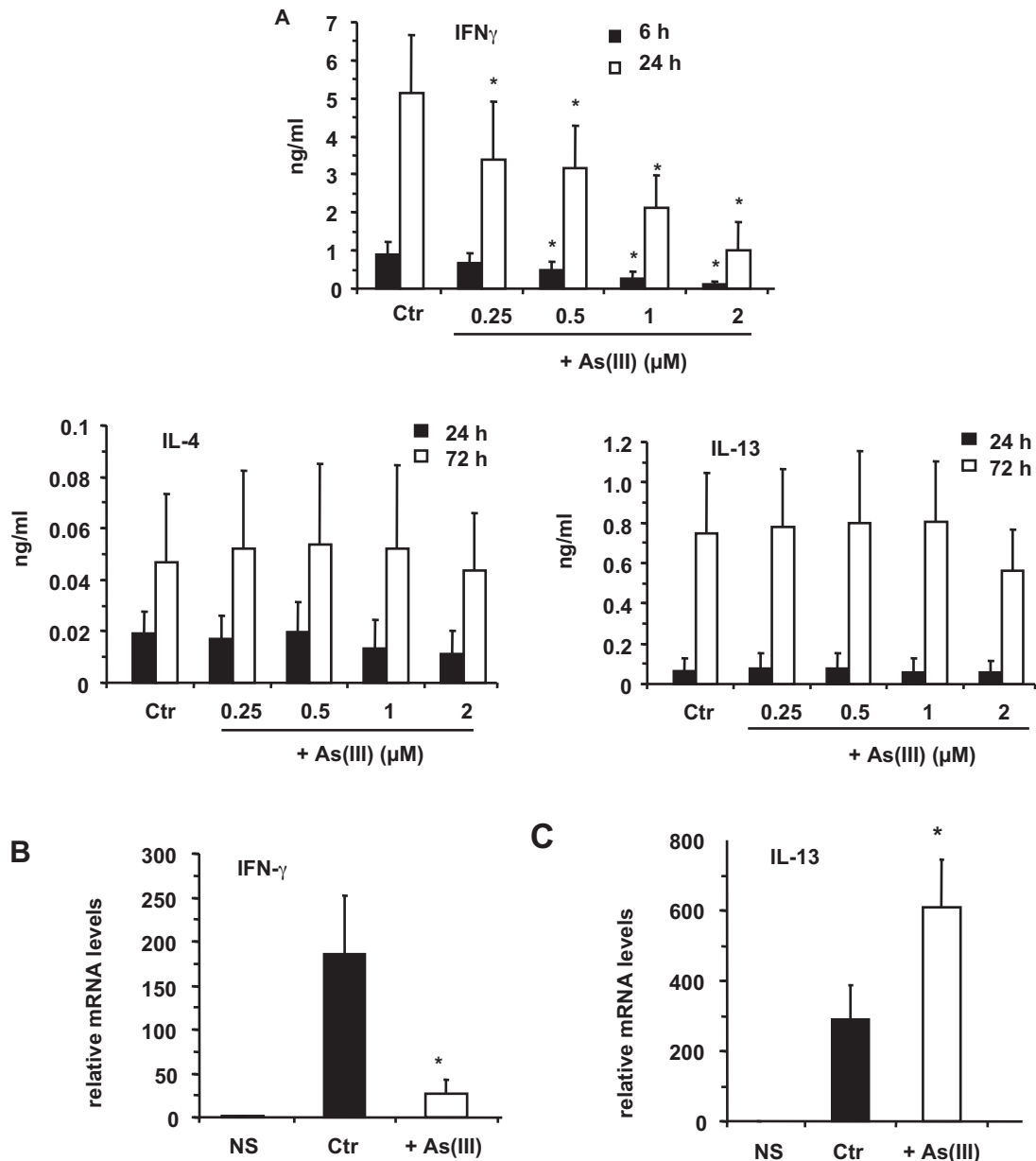


Fig. 7. Effects of As(III) on IFN- γ , IL-4 and IL-13 expression in stimulated T cells. Cells were untreated (Ctrl), pre-treated with 2 μ M (B, C) or with the indicated concentrations (A) of As(III) for 2 h. Cells were then non stimulated (NS), stimulated with aCD3/aCD28 for 6 h (B), 24 h (C) or for the indicated times (A) in the absence or presence of As(III). In (A), IFN- γ , IL-4 and IL-13 levels in culture medium were analyzed by ELISA. In (B) and (C), total RNAs were isolated and mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in As(III)-untreated and non-stimulated T cells, arbitrarily set at the value of 1. Results are expressed as means \pm SD of at least 4 independent experiments. * $p < 0.05$ versus Ctrl.

genes. Notably, the metalloid dose-dependently up-regulates HMOX1 mRNA levels in T cells activated for 2 h (Fig. 8A). HMOX1 gene expression was still potently increased in cells co-stimulated for 6 h and 24 h (Fig. 8B). As(III) also markedly induces mRNA levels of NQO1 and GCLM in T cells activated for 6 h (Fig. 8C); however, the metalloid does not induce expression of the oxidative stress-related genes FOXO1, NRF2 and RELA genes that encodes the transcription factors Foxo1, Nrf2 and p65-NF- κ B, respectively (Fig. 8D). In addition, it does not increase ROS levels, which remain similar in T cells, pre-treated or not with the metalloid, and stimulated for up to 72 h with aCD3/aCD28 (Fig. 8E). H_2O_2 (100 μ M), used as a positive control for ROS detection, was incubated for 2 h with non stimulated T cells.

4. Discussion

We demonstrate in the present study that As(III) significantly reduces proliferation of co-stimulated T cells, independently of its repressive effect on IL-2 expression, and markedly alters the pattern of cytokines secreted by these activated T cells.

We first report that the metalloid reduces proliferation of CD3+ T cells co-stimulated with aCD3/aCD28 or with mature DCs which mimic both physiological TCR engagement and CD28 receptor activation. However, since aCD3/aCD28 are, of course, different from natural antigens activating T cells, the use of superantigens (such as Staphylococcus enterotoxins B) or recall antigens (such as tetanus toxoid or Candida albicans extracts) may give additional

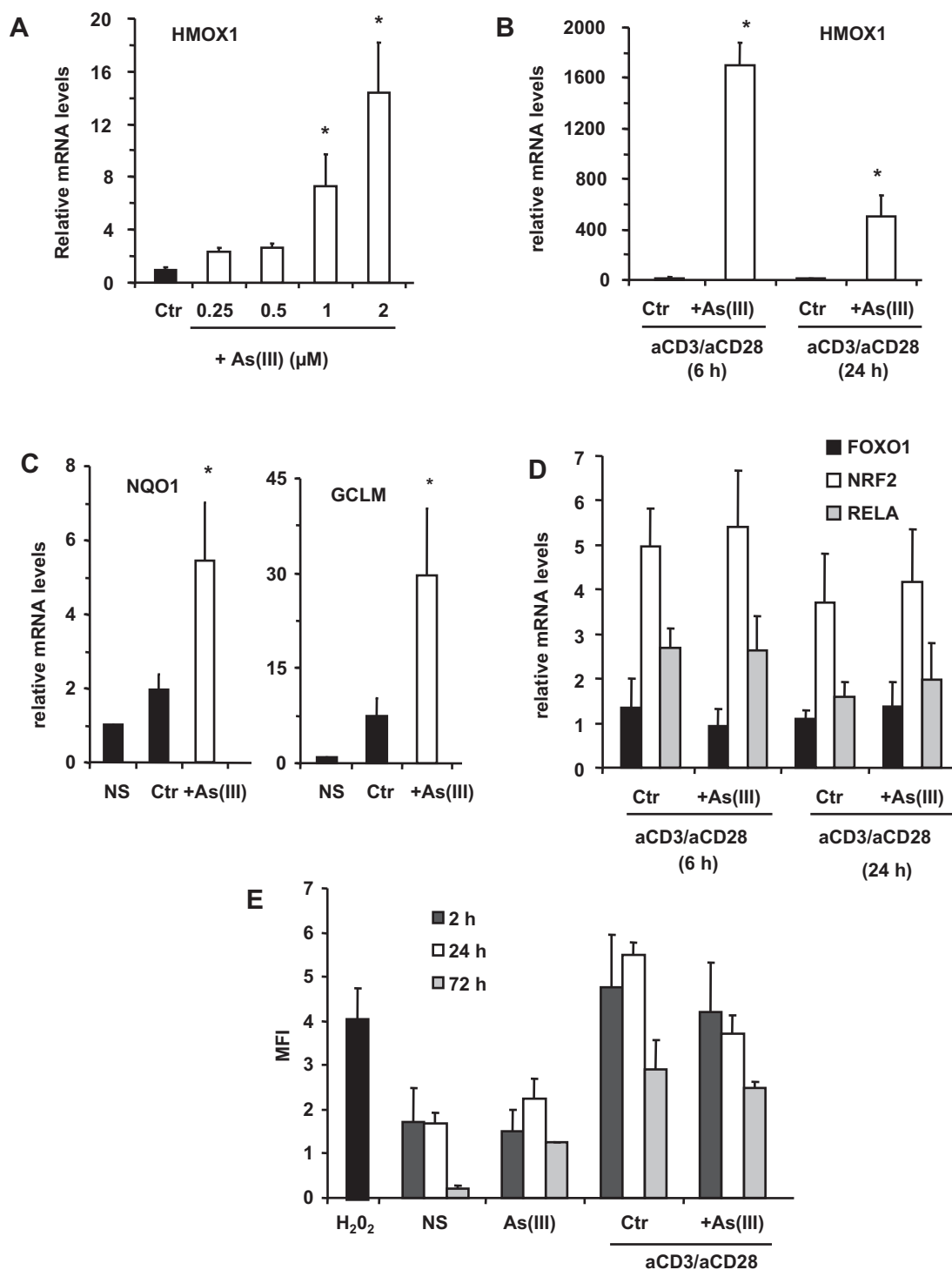


Fig. 8. As(III) markedly increases expression of stress genes in activated T cells. Cells were untreated (Ctrl), pre-treated with 2 μM As(III) (B–E), H₂O₂ (100 μM) (E) or with indicated concentrations of the metalloid (A) for 2 h. Cells were then non stimulated (NS), stimulated with aCD3/aCD28 for 2 h (A, E), 6 h (B–D), 24 h (B, D, E) or 72 h (E) in the absence or presence of As(III). In (A)–(D), total RNAs were isolated and mRNA levels of stress genes were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in As(III)-untreated and non-stimulated T cells, arbitrarily set at the value of 1. In (E) ROS levels were determined by flow cytometry using the redox-sensitive 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate dye. Results are expressed as means ± SD of at least 4 independent experiments. * *p* < 0.05 versus Ctrl.

information on the impact of As(III) toward antigen-specific lymphoid reactions. Inhibition of T cell proliferation does not result from direct cytotoxicity since As(III) does not modify cell viability. In contrast, the fact that total DNA amount in cells previously pre-treated with As(III) was still significantly reduced after a second round of stimulation in a As(III)-free culture medium, rather suggests that As(III) selectively interferes with molecular events

controlling cell proliferation. Indeed, analysis of cell division and cell cycle by flow cytometry demonstrates that As(III) significantly reduces the number of dividing CD3+ T cells and markedly increases the percentage of cells blocked in G1 phase. Progression of G1 to S-phase is mainly controlled in activated T cells by the induction of IL-2 expression (Nourse et al., 1994; Cantrell and Smith, 1984). Interestingly, we found that As(III) significantly reduces

secretion of IL-2, as previously observed in lectin-stimulated PBMCs (Galicia et al., 2003; Soto-Pena et al., 2006). However, in contrast to these studies using phytohemagglutinin stimulation (Vega et al., 1999), we show that addition of recombinant human IL-2 in culture medium could not reverse As(III)-dependent inhibition of T cell proliferation. It should be noted that the levels of IL-2 secreted by As(III)-pre-treated cells, although markedly reduced, are not negligible and may be sufficient to control cell cycle progression. This idea is supported by the fact that degradation of the CDK inhibitor p27^{kip1}, which is strongly controlled by IL-2 (Nourse et al., 1994), is not blocked in activated T cells pre-treated with As(III). Consequently, growth inhibitory effects of the metalloid appear independent of IL-2 gene repression and more probably result from direct effects of As(III) on particular cell cycle proteins.

In accordance with this hypothesis, we show that As(III) significantly reduces the induction of cyclin D3 expression, which, in addition to the CDK inhibitor down-regulation, is required to activate CDK4/6 and allow G1 progression (Ajchenbaum et al., 1993). As(III) effect toward cyclin D3 expression seems selective since the metalloid alters neither the expression of cyclin D2 nor that of cyclin E, two other cyclins involved in G1/S-phase transition. We demonstrate that the metalloid also significantly decreases expression of the phosphatase CDC25A induced by aCD3/aCD28. CDC25A removes inhibitory phosphates from cyclin E/CDK2 and cyclin-A/CDK2 complexes and promotes S-phase entry (Boutros et al., 2006). As(III) has previously been demonstrated to repress expression of CDC25 isoforms in other cell types. Notably, the metalloid slows S phase progression in monocytic U937 cells notably by inhibition of CDC25A transcription (Lehmann and McCabe, 2007), and it arrests pulmonary BEAS-2B cells in G2/M phase by inducing proteosomal-dependent degradation of CDC25C (Chen et al., 2002). Although inhibition of both cyclin D3 and CDC25A expression likely contributes to the blockage of As(III)-pre-treated T cells in G1 phase, the possibility that the metalloid triggers other molecular events such as an increase of CDK inhibitor p21 expression (Park et al., 2000), or an inhibition of CDK activity, cannot be ruled out.

Besides growth inhibitory effects, we found that As(III) also alters the pattern of cytokines expressed by activated T cells. Particularly, it represses, not only IL-2 gene expression, but also that of IFN- γ at both mRNA and protein levels. In contrast, it does not affect IL-4 and IL-13 secretions although it significantly increases mRNA levels of IL-13 gene. This is probably related to the fact that results of cytokine quantification (ELISA) were not normalized to cell numbers. Indeed, As(III)-exposed cells produce more IL-13 mRNAs but proliferate at a lower rate than non exposed cells. Thus, the amount of IL-13 generated per cell is probably higher in As(III)-exposed T cells than in non exposed cells. IFN- γ is a Th1 cytokine that takes part into anticancerous immunosurveillance and provides protection against intracellular pathogens and viruses. In contrast, IL-4 and IL-13 are Th2 cytokines which help to eradicate extracellular parasites. In addition, they are involved in asthma and allergy. Our results thus demonstrate that As(III) likely alters the balance of Th1/Th2 cytokine toward a Th2 response. To be confirmed, such an effect of iAs on the immune system should be further investigated in adequate *in vivo* models.

The specific molecular mechanisms by which As(III) alters cell cycle protein and cytokine expression have not been investigated in the present study. Nevertheless, it is well-known that As(III) frequently impairs cell function and gene expression by inducing intracellular oxidative stress (Kumagai and Sumi, 2007). The metalloid can modify cell signaling by directly oxidizing cysteine residues in key proteins or by increasing ROS levels. Our results show that immune effects of As(III) are closely associated with a rapid induction of the stress genes HMOX1, GCLM and NQO1

without modification of ROS levels. These genes are well-known to be induced by activation of the nuclear factor (erythroid-derived)-like 2 also named Nrf2. In quiescent cells, Nrf2 is linked to the cytoplasmic protein Keap1 and is rapidly degraded by proteasome. Keap1 activity is highly regulated by the redox status of its cysteine residues. Particularly, iAs can oxidize C151 residue in Keap1 which reduces its affinity for Nrf2 and promotes Nrf2 translocation in nuclei (He and Ma, 2010). Nuclear Nrf2 heterodimerizes with Maf proteins and binds to anti-oxidant responsive elements in GCLM or NQO1 gene, and finally induces transcriptional activity of these stress genes (Kensler et al., 2007). Interestingly, it has recently been demonstrated that the electrophilic compound *ter-butylhydroquinone* represses IFN- γ expression and increases that of IL-13 in murine T cells activated with aCD3/aCD28 (Rockwell et al., 2012). This compound also strongly activates Nrf2 and stimulates expression of various stress genes including that of NQO1 in T cells isolated from wild-type mice. In contrast, *ter-butylhydroquinone* alters neither gene coding for cytokines nor stress genes in T cells isolated from Nrf2^{−/−} mice, which suggests that Nrf2 activation may play a role in the repression of cytokine expression induced by *ter-butylhydroquinone* in T cells. Thus, it may be hypothesized that, like *ter-butylhydroquinone*, As(III), may alter gene expression in human T cells by oxidizing specific signaling proteins that leads to Nrf2 activation.

In conclusion, our results demonstrate that iAs inhibits proliferation of T cells, independently of IL-2, and alters the pattern of cytokines secreted by human activated T cells. Taken together, they fully support the conclusion that T cells constitute direct major targets of this environmental contaminant.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.025>.

References

- Ajchenbaum, F., Ando, K., DeCaprio, J.A., Griffin, J.D., 1993. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 4113–4119.
- Argos, M., Kalra, T., Rathouz, P.J., Chen, Y., Pierce, B., Parvez, F., Islam, T., Ahmed, A., Rakibuz-Zaman, M., Hasan, R., Sarwar, G., Slavkovich, V., van Geen, A., Graziano, J., Ahsan, H., 2010. Arsenic exposure from drinking water, and all-cause and chronic-disease mortalities in Bangladesh (HEALS): a prospective cohort study. *Lancet* 376, 252–258.
- Banerjee, N., Banerjee, S., Sen, R., Bandyopadhyay, A., Sarma, N., Majumder, P., Das, J.K., Chatterjee, M., Kabir, S.N., Giri, A.K., 2009. Chronic arsenic exposure impairs macrophage functions in the exposed individuals. *J. Clin. Immunol.* 29, 582–594.
- Binet, F., Girard, D., 2008. Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH2-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1613–1622.
- Biswas, R., Ghosh, P., Banerjee, N., Das, J.K., Sau, T., Banerjee, A., Roy, S., Ganguly, S., Chatterjee, M., Mukherjee, A., Giri, A.K., 2008. Analysis of T-cell proliferation and cytokine secretion in the individuals exposed to arsenic. *Hum. Exp. Toxicol.* 27, 381–386.
- Bourdonnay, E., Morzadec, C., Sparfel, L., Galibert, M.D., Jouneau, S., Martin-Chouly, C., Fardel, O., Vernhet, L., 2009a. Global effects of inorganic arsenic on gene expression profile in human macrophages. *Mol. Immunol.* 46, 649–656.
- Bourdonnay, E., Morzadec, C., Fardel, O., Vernhet, L., 2009b. Redox-sensitive regulation of gene expression in human primary macrophages exposed to inorganic arsenic. *J. Cell. Biochem.* 107, 537–547.
- Boutros, R., Dozier, C., Ducommun, B., 2006. The when and where of CDC25 phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 185–191.
- Cantrell, D.A., Smith, K.A., 1984. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 224, 1312–1316.
- Ceuppens, J.L., Baroja, M.L., Lorre, K., Van Damme, J., Billiau, A., 1988. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. *J. Immunol.* 141, 3868–3874.

- Chen, F., Zhang, Z., Bower, J., Lu, Y., Leonard, S.S., Ding, M., Castranova, V., Piwnicka-Worms, H., Shi, X., 2002. Arsenite-induced Cdc25C degradation is through the KEN-box and ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1990–1995.
- Chen, Y., Parvez, F., Gamble, M., Islam, T., Ahmed, A., Argos, M., Graziano, J.H., Ahsan, H., 2009. Arsenic exposure at low-to-moderate levels and skin lesions, arsenic metabolism, neurological functions, and biomarkers for respiratory and cardiovascular diseases: review of recent findings from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study (HEALS) in Bangladesh. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 184–192.
- Das, N.K., Sengupta, S.R., 2008. Arsenicosis: diagnosis and treatment. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 74, 571–581.
- Davis, L., Lipsky, P.E., 1986. Signals involved in T cell activation. II. Distinct roles of intact accessory cells, phorbol esters, and interleukin 1 in activation and cell cycle progression of resting T lymphocytes. *J. Immunol.* 136, 3588–3596.
- Euvrard, S., Kanitakis, J., Claudy, A., 2003. Skin cancers after organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 348, 1681–1691.
- Galicia, G., Leyva, R., Tenorio, E.P., Ostrosky-Wegman, P., Saavedra, R., 2003. Sodium arsenite retards proliferation of PHA-activated T cells by delaying the production and secretion of IL-2. *Int. Immunopharmacol.* 3, 671–682.
- He, X., Ma, Q., 2010. Critical cysteine residues of Kelch-like ECH-associated protein 1 in arsenic sensing and suppression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 66–75.
- Jungo, F., Dayer, J.M., Modoux, C., Hyka, N., Burger, D., 2001. IFN-beta inhibits the ability of T lymphocytes to induce TNF-alpha and IL-1beta production in monocytes upon direct cell-cell contact. *Cytokine* 14, 272–282.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S., 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89–116.
- Kozul, C.D., Ely, K.H., Enelow, R.I., Hamilton, J.W., 2009. Low-dose arsenic compromises the immune response to influenza A infection in vivo. *Environ. Health Perspect.* 117, 1441–1447.
- Kumagai, Y., Sumi, D., 2007. Arsenic: signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 243–262.
- Laupeze, B., Amiot, L., Sparfel, L., Le Ferrec, E., Fauchet, R., Fardel, O., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 168, 2652–2658.
- Lehmann, G.M., McCabe, M.J., 2007. Arsenite slows S phase progression via inhibition of cdc25A dual specificity phosphatase gene transcription. *Toxicol. Sci.* 99, 70–78.
- Lemarie, A., Morzadec, C., Merino, D., Micheau, O., Fardel, O., Vernhet, L., 2006a. Arsenic trioxide induces apoptosis of human monocytes during macrophagic differentiation through nuclear factor-kappaB-related survival pathway down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 304–314.
- Lemarie, A., Morzadec, C., Bourdonnay, E., Fardel, O., Vernhet, L., 2006b. Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic. *J. Immunol.* 177, 3019–3027.
- Lysechko, T.L., Ostergaard, H.L., 2005. Differential Src family kinase activity requirements for CD3 zeta phosphorylation/ZAP70 recruitment and CD3 epsilon phosphorylation. *J. Immunol.* 174, 7807–7814.
- Martin-Chouly, C., Morzadec, C., Bonvalet, M., Galibert, M.D., Fardel, O., Vernhet, L., 2011. Inorganic arsenic alters expression of immune and stress response genes in activated primary human T lymphocytes. *Mol. Immunol.* 48, 956–965.
- Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W.M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M.H., Massague, J., Crabtree, G.R., Roberts, J.M., 1994. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372, 570–573.
- Park, W.H., Seol, J.G., Kim, E.S., Hyun, J.M., Jung, C.W., Lee, C.C., Kim, B.K., Lee, Y.Y., 2000. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis. *Cancer Res.* 60, 3065–3071.
- Rahman, A., Vahter, M., Ekstrom, E.C., Persson, L.A., 2011. Arsenic exposure in pregnancy increases the risk of lower respiratory tract infection and diarrhea during infancy in Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* 119, 719–724.
- Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H.M., Prabhakar, U., 2004. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J. Immunol. Methods* 293, 127–142.
- Rockwell, C.E., Zhang, M., Fields, P.E., Klaassen, C.D., 2012. Th2 skewing by activation of Nrf2 in CD4+ T cells. *J. Immunol.* 188, 1630–1637.
- Rossman, T.G., Uddin, A.N., Burns, F.J., 2004. Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 394–404.
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I., Trapani, J.A., 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2, 293–299.
- Soto-Pena, G.A., Luna, A.L., Acosta-Saavedra, L., Conde, P., Lopez-Carrillo, L., Cebrian, M.E., Bastida, M., Calderon-Aranda, E.S., Vega, L., 2006. Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *FASEB J.* 20, 779–781.
- Soto-Pena, G.A., Vega, L., 2008. Arsenic interferes with the signaling transduction pathway of T cell receptor activation by increasing basal and induced phosphorylation of Lck and Fyn in spleen cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 216–226.
- Tenorio, E.P., Saavedra, R., 2005. Differential effect of sodium arsenite during the activation of human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1853–1869.
- Vega, L., Ostrosky-Wegman, P., Fortoul, T.I., Diaz, C., Madrid, V., Saavedra, R., 1999. Sodium arsenite reduces proliferation of human activated T-cells by inhibition of the secretion of interleukin-2. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 21, 203–220.